



**Programa de Doctorado en Ciencias de la  
Alimentación**

## **TESIS DOCTORAL**

**Sensibilidad al trigo y gluten no celiaca.  
Identificación de la enfermedad y manejo  
nutricional**

Presentada por:

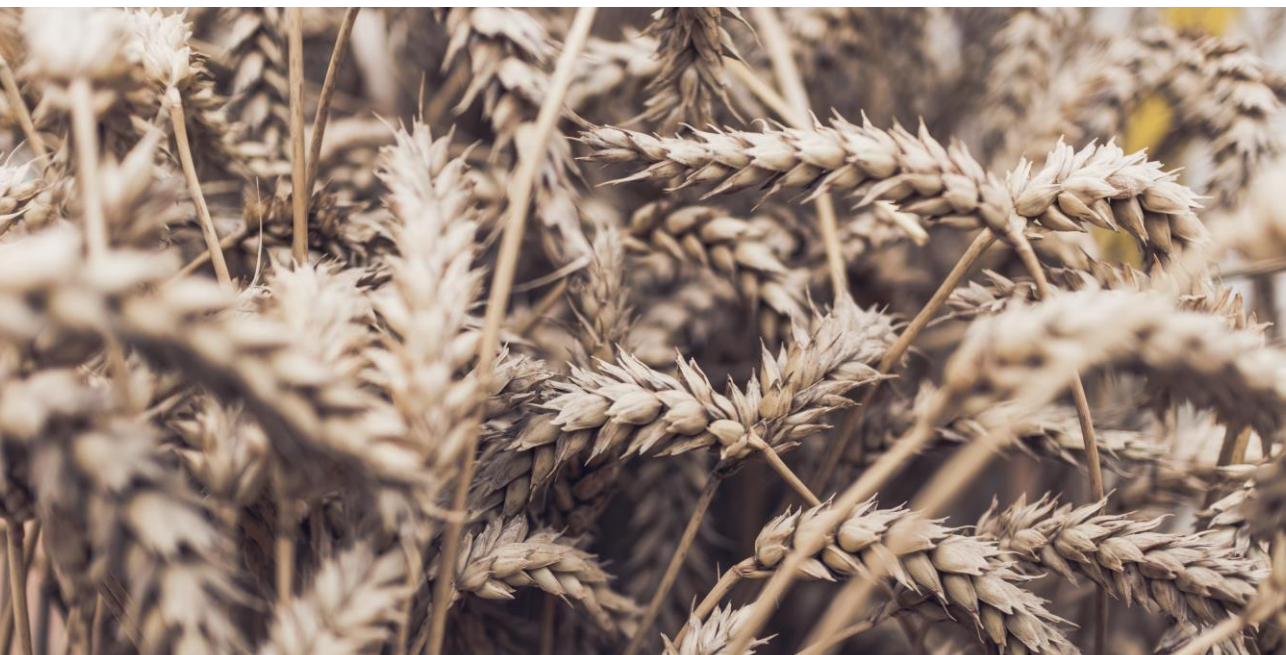
**Yolanda Reig Otero**

Dirigida por:

**Dra. Cristina Juan García**

**Dra. Lara Manyes i Font**

Valencia, Enero 2019







## **Programa de Doctorado en Ciencias de la Alimentación**

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  Facultat de Farmàcia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal.

### **Sensibilidad al trigo y gluten no celiaca. Identificación de la enfermedad y manejo nutricional.**

Tesis Doctoral

Valencia, Enero 2019

Presentada por:

**Yolanda Reig Otero**

Dirigida por:

**Dra. Cristina Juan García**

**Dra. Lara Manyes i Font**



La **Dra. Cristina Juan García**, Profesora Titular de la Universitat de València y la **Dra. Lara Manyes i Font**, Profesora Ayudante Doctora de la Universitat de València,

CERTIFICAN QUE:

La licenciada en Ciencias Químicas **Yolanda Reig Otero** ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título **Sensibilidad al trigo y gluten no celiaca. Identificación de la enfermedad y manejo nutricional**, y autorizan su presentación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, expiden y firman el siguiente certificado.

Burjassot, Enero 2019

**Dra. Cristina Juan García**



**Dra. Lara Manyes i Font**





Este trabajo ha dado lugar a 3 artículos publicados en las siguientes revistas científicas:

- 1.** Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. Sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC): manejo nutricional de la enfermedad. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.* 2017; 37: 179-190.
- 2.** Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. Amylase-trypsin Inhibitors in wheat and other cereals as potential activators of the effects of non-celiac gluten sensitivity (NCGS). *J. Med. Food.* 2017; 21(3), 207-214.
- 3.** Reig-Otero Y, Mañes J, Juan-García C, Manyes L. Análisis de los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal. *Rev. Toxicol.* 2018; 35: 45 – 52.





# RESUMEN

---

La sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) es un trastorno caracterizado por síntomas tanto intestinales como extraintestinales con la ingestión de alimentos que contienen gluten en individuos con un diagnóstico negativo para la enfermedad celiaca (EC) y alergia al gluten/trigo (AG). Los estudios más recientes señalan que los síntomas podrían ser causa de la ingesta no solo del gluten, sino de otros componentes vinculados al trigo como los inhibidores de la amilasa y la tripsina (ATIs) y los carbohidratos de cadena corta (oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos) y polioles (FODMAPS). El tratamiento establecido hasta el momento para evitar estos síntomas es la dieta sin gluten (DSG), aunque se han revisado otras estrategias dietéticas y farmacológicas que podrían aplicarse en esta patología.

Hasta el momento, no se ha definido ningún biomarcador que identifique este trastorno y que permita su diagnóstico rápido y sencillo. En la actualidad, el único método reconocido por la comunidad científica para su diagnóstico es a través de un ensayo doble ciego aleatorio con placebo (DCACP) con gluten una vez que se han descartado la EC y la AG. Así mismo, existe una vinculación la SGNC con otras patologías neurológicas, reumáticas e intestinales.

El análisis de las publicaciones revisadas indica que en la SGNC existe una activación mayoritaria del sistema inmune innato a diferencia de lo que ocurre con la EC cuyos síntomas están relacionados con una reacción autoinmune donde la predisposición genética del paciente es fundamental e implica tanto a la inmunidad innata como la adaptativa.

Diversos estudios han demostrado, en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, que los ATIs son unas proteínas que tienen la capacidad de activar fuertemente el

sistema inmunitario innato provocando un aumento de la expresión de los receptores TLR en el intestino. En este sentido, estos trabajos cuestionan el rol de la gliadina del gluten en la activación del sistema inmune innato en la SGNC dado que, al utilizar gliadina digerida con pepsina y tripsina como reactivo, no se observan alteraciones significativas.

Se observan incoherencias cuando se comparan los resultados de los distintos estudios DCACP realizados para analizar cómo influye la ingestión de gluten en los síntomas de las personas identificadas con SGNC. Esto es debido a la dificultad de identificar a grupos de individuos con SGNC homogéneos como consecuencia de la inexistencia de biomarcadores y a la posible superposición de los efectos del gluten, los ATIs y los FODMAPS del trigo utilizado. Asimismo, diversos trabajos comprueban que las muestras comerciales de gluten utilizadas para los ensayos contienen cantidades significativas de ATIs, indicando que estas proteínas han sido un contaminante interfiriente en los resultados obtenidos.

Los resultados de los estudios que evalúan la concentración de la interleucina IL-8 y otras citoquinas características de la activación del sistema inmune innato, en cultivos celulares de enfermos sensibles al trigo, revelan que la capacidad proinflamatoria de los ATIs es muy superior en cereales que contienen gluten. Asimismo, estos ensayos indican que la actividad proinflamatoria de los ATIs es inferior en alimentos procesados térmicamente respecto a los cereales en crudo. Esta capacidad está relacionada con su estructura secundaria y terciaria y del estado de agregación que se encuentran, pudiéndose clasificar los alimentos según su capacidad de activar el sistema inmune innato.

En la SGNC, la existencia de una alteración en la barrera intestinal es la condición inicial para que se inicie toda la cascada de señales en el sistema inmune.

Esto puede ser debido principalmente a infecciones previas de parásitos, bacterias o virus, al desequilibrio en la flora intestinal, al consumo continuado de antibióticos y antiinflamatorios o a la existencia de enfermedades autoinmunes. En este sentido, la revisión realizada indica que la restauración y modulación de la microbiota intestinal es una de las vías para el tratamiento de la SGNC.

Aunque las técnicas analíticas para identificar los ATIs en alimentos más utilizadas están basadas en la espectrometría de masas (MS), esta revisión pone en evidencia la variedad de métodos utilizados y la no existencia de un consenso científico en un método rápido, fiable, contrastable y económicamente viable para utilizarlo en el análisis rutinario de los alimentos. Asimismo, es necesario disponer de materiales de referencia imprescindibles para validar el método usado por los laboratorios prioritariamente a través de un estudio interlaboratorio.

Por último, este trabajo pone en relieve que la alimentación es un elemento preventivo y terapéutico para tratar trastornos como SGNC, y que el diseño de dietas y alimentos con una reducción de los componentes proinflamatorios, como son los ATIs, abre nuevas líneas de investigación prometedoras aplicables no solo para la SGNC sino para otras muchas patologías no celiacas que se han asociado con el consumo del trigo.

**PALABRAS CLAVE:** Trigo, gluten, sensibilidad al trigo, inhibidores de la amilasa y la tripsina, inmunidad innata, técnicas analíticas.



# ABSTRACT

---

Non-coeliac gluten sensitivity (NCGS) is a disorder characterized by both intestinal and extra-intestinal symptoms with the ingestion of gluten-containing foods in individuals with a negative diagnosis for celiac disease (CD) and gluten/wheat allergy (GA). The most recent studies show that symptoms may be the cause of intake not only of gluten, but of other wheat-related components such as amylase and trypsin inhibitors (ATIs) and low fermentable, oligo-, di-, mono-saccharides and polyol (FODMAPS). The treatment established so far to avoid these symptoms is the gluten-free diet (GFD), although other dietary and pharmacological strategies that could be applied in this pathology have been reviewed.

So far, no biomarker has been defined that identifies this disorder and allows its rapid and simple diagnosis. At present, the only method recognized by the scientific community for its diagnosis is through a double-blind randomized placebo trial (DBRP) with gluten once EC and GA have been ruled out. There is also a link between NCGS and other neurological, rheumatic and intestinal pathologies.

The analysis of the reviewed publications indicates that in the NCGS pathology there is a majority activation of the innate immune system unlike what happens with CD whose symptoms are related to an autoimmune reaction where is fundamental the genetic predisposition of the patient and involves both innate and adaptive immunity.

Several studies have shown, in both in vitro and in vivo assays, that ATIs are proteins that could strongly activate the innate immune system causing an increase in the expression of TLR receptors in the gut. In this sense, these works question the role of gluten gliadin in the activation of the innate immune system in

the NCGS since, when using digested gliadin with pepsin and trypsin as a reagent, no significant alterations are observed.

Inconsistencies are observed when comparing the results of the different DBRP studies performed to analyze how gluten ingestion influences the symptoms of patients identified with NCGS. This is due to the difficulty of identifying homogeneous groups of individuals with NCGS due to the lack of biomarkers and the possible overlap of the effects of gluten, ATIs and FODMAPS of the wheat used. Also, several studies prove that the commercial gluten samples used for the assays contain significant amounts of ATIs, indicating that these proteins have been an interfering contaminant in the results obtained.

Studies evaluating the concentration of IL-8 interleukin and other cytokines characteristic of the activation of the innate immune system in cell cultures of wheat-sensitive patients, reveal that the pro-inflammatory capacity of ATIs is much higher in cereals containing gluten. With these assays it has been possible to determine the pro-inflammatory activity of ATIs observing that it is lower in heat-processed foods than in raw cereals. This capacity is linked to its secondary and tertiary structure and the state of aggregation found, allowing foods to be classified according to their ability to activate the innate immune system.

The existence of an alteration in the intestinal barrier is the initial condition in the NCGS for the activation of the immune system. This can be due mainly to previous infections of parasites, bacteria or viruses, imbalance in the intestinal flora, continued consumption of antibiotics and anti-inflammatory drugs, or the existence of autoimmune diseases. In this sense, the review indicates that the restoration and modulation of the intestinal microbiota is a promised way to treat NCGS.

Although the analytical techniques for identifying ATIs in foods are based on mass spectrometry (MS), this review highlights the variety of methods used and the lack of scientific consensus on a rapid, reliable, verifiable and economically viable method for use in routine food analysis. In addition, it is necessary to have the necessary reference materials to validate the method used by the laboratories as a priority through an interlaboratory study.

Finally, this work highlights that food is a preventive and therapeutic element to treat disorders such as NCGS, and that the design of diets and foods with a reduction of pro-inflammatory components, such as ATIs, opens new promising lines of research applicable not only for NCGS but for many other non-coeliac pathologies that have been associated with the consumption of wheat.

**KEY WORDS:** Wheat, gluten, wheat sensitivity, amylase and trypsin inhibitors, innate immunity, analytical techniques





*Dicen que el tiempo puede cambiar las cosas, pero  
en realidad sólo las puedes cambiar tú mismo.*

*Andy Warhol*



## *A mi familia*

*Y a todas las personas que me habéis ayudado, apoyado  
y empujado a alcanzar una de las metas  
más importantes de mi vida.*

*Gracias, os llevo en el corazón siempre.*



# Índice de contenidos

---

Índice de tablas.....	XIX
Índice de figuras.....	XXI
Lista de abreviaturas.....	XXIII
1. Introducción .....	1
1.1 Prevalencia .....	5
1.2 Sintomatología.....	8
1.3 Biomarcadores.....	10
1.4 Patogénesis.....	14
1.4.1 Función barrera intestinal .....	15
1.4.2 Rol del sistema inmunitario innato frente el adaptativo .....	17
1.5 Iniciadores de la SGNC .....	20
1.5.1 El gluten.....	25
1.5.2 Inhibidores de la amilasa y/o la tripsina en cereales.....	28
1.5.3 Los FODMAPS .....	33
1.5.4 Aglutininas del germen del trigo.....	39
1.6 Tratamiento nutricional .....	42
1.6.1 Estrategias para el tratamiento de patologías relacionadas con el gluten.....	44
1.6.2 La dieta baja en FODMAPs .....	52
2. Objetivos .....	59
3. Resultados.....	63

3.1	Sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC): manejo nutricional de la enfermedad .....	63
3.2	Los inhibidores de las amilasas y las tripsinas en el trigo y otros cereales potenciales activadores de los efectos de la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) .....	103
3.3	Análisis de los inhibidores de las $\alpha$ -amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal.....	137
4.	Discusión general.....	177
4.1	ATIs.....	179
4.2	FODMAPS .....	184
4.3	Alimentos procesados .....	185
4.4	La respuesta inmunitaria en la SGNC.....	188
4.5	Determinación de ATIs.....	191
5.	Conclusiones.....	201
6.	Publicaciones en revistas científicas.....	205
7.	Contribuciones a congresos .....	213
8.	Bibliografía .....	219

# Índice de tablas

---

Tabla 1. Estudios de prevalencia SGNC del año 2012 al 2018. ....	5
Tabla 2. Síntomas de la SGNC.....	9
Tabla 3. Complicaciones de la SGNC.....	10
Tabla 4. Biomarcadores para la EC y para la SGNC.....	13
Tabla 5. Fructosa, fuentes alimentarias y acción en el intestino.....	35
Tabla 6. Lactosa, fuentes alimentarias y acción en el intestino. ....	36
Tabla 7. Polioles, fuentes alimentarias y acción en el intestino. ....	37
Tabla 8. Oligosacáridos, fuentes alimentarias y acción en el intestino. ...	38
Tabla 9. Tratamientos nutricionales para la reducción de la toxicidad del gluten. ....	42
Tabla 10. Alimentos con gluten y alimentos que pueden contener gluten. ....	45
Tabla 11. Lista de alimentos de alto y bajo contenido en FODMAPs sustitutivos. ....	53
Tabla 12. Relación de la expresión de los TLRs y la inmunidad innata en EC y SGNC en modelos murinos. ....	178
Tabla 13. Alérgenos identificados en las tres fracciones del trigo.....	181
Tabla 14. Grado de bioactividad de cereales y legumbres y estructura de los ATIs. ....	183





# Índice de figuras

---

Figura 1. Tendencia del número de publicaciones respecto al SGNC en los últimos 10 años.....	3
Figura 2. Mecanismos involucrados en la EC y en la SGNC.....	14
Figura 3. Mucosa duodenal de un paciente sin EC y de un paciente con enfermedad celiaca al diagnóstico. ....	15
Figura 4. Posibles efectos de los diferentes componentes del trigo que contribuyen a la sintomatología de la SGNC.....	22
Figura 5. Evolución de las especies diploides de trigo hacia especies tetraploides y hexaploides por hibridación natural.....	26
Figura 6. Estructura del gluten. ....	28
Figura 7. Representación de las estructuras 3D de inhibidores de la familia de los cereales: Inhibidor de la amilasa y la tripsina del trigo.....	30



## Lista de abreviaturas

---

<b>AG</b>	Alergia al gluten/trigo
<b>AGA</b>	Anticuerpos antigliadina
<b>AGCC</b>	Ácidos grasos de cadena corta
<b>AGCL</b>	Ácidos grasos de cadena larga
<b>AGT</b>	Aglutinina del germen de trigo
<b>AN-PEP</b>	Propil-endopeptidasa derivada del <i>Aspergillus niger</i>
<b>ARNr 16s</b>	ARN ribosomal 16S
<b>ATIs</b>	Inhibidores de la amilasa y tripsina
<b>AU-PAGE</b>	Electroforesis sobre gel de poliacrilamida-ácido acético-urea
<b>CHAPS</b>	3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato)
<b>CLDN-4</b>	Claudina 4
<b>CLIs</b>	Células linfoides innatas
<b>CPA</b>	Células presentadoras de antígenos
<b>DCACP</b>	Ensayo doble ciego aleatorio y controlado con placebo
<b>DSG</b>	Dieta sin gluten
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E2D</b>	Electroforesis bidimensional
<b>EC</b>	Enfermedad celiaca
<b>ECL</b>	Endomicroscopia confocal por Láser
<b>EII</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

<b>EP-B2</b>	Endoproteasa B, isoforma 2
<b>ESI</b>	Espectrómetro de masas con fuente de ionización tipo electrospray
<b>FABP2</b>	Proteína transportadora de ácidos grasos
<b>FAI</b>	Fosfatasa alcalina intestinal
<b>FODMAPS</b>	Carbohidratos de cadena corta rápidamente fermentables
<b>FOS</b>	Fructooligosacáridos
<b>GOS</b>	Galactooligosacáridos
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios de histocompatibilidad
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>HPP</b>	Pasteurización hiperbárica
<b>IEF</b>	Electroforesis de isoelectroenfoque
<b>IFN-γ</b>	Interferón gamma
<b>IPG</b>	Electroforesis con gradiente de pH inmovilizado
<b>iTRAQ</b>	Técnica de marcaje isobárico
<b>LIEs</b>	Linfocitos Intraepiteliales
<b>LPB</b>	Proteína fijadora de lipopolisacárido
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LPTs</b>	Proteínas transportadoras de lípidos
<b>LTQ-OrbiTrap</b>	Sistema híbrido de espectrómetro de masas Orbitrap y trampa iónica
<b>MALDI</b>	Espectrómetro de masas con fuente de ionización por desorción con láser asistida por una matriz
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>MS<sup>E</sup></b>	Espectrómetro de masas con medida simultánea en baja y alta energía de colisión

<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloides 88
<b>Neu5Ac</b>	Ácido N-acetilneuramínico
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periféricas
<b>pI</b>	Punto isoeléctrico
<b>PRC-HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa
<b>PRRs</b>	Patrones de reconocimiento de patógenos
<b>sCD14</b>	Moléculas inflamatorias CD14 soluble
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato Sódico
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis con gel de poliacrilamida
<b>SGI</b>	Sistema gastro intestinal
<b>SGNC</b>	Sensibilidad al gluten no celiaca
<b>SII</b>	Síndrome del intestino irritable
<b>STNC</b>	Sensibilidad al trigo no celiaca
<b>TEER</b>	Técnica resistencia eléctrica transepitelial
<b>TG2</b>	Transglutaminasa tisular
<b>TLRs</b>	Receptores tipo Toll
<b>TOF</b>	Detector tiempo de vuelo
<b>UHT</b>	Ultra pasteurización
<b>UPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución
<b>Western Blot</b>	Electro transferencia con membranas de nitrocelulosa



# Introducción







# 1. Introducción

---

Desde hace 10.000 años el trigo forma parte de la dieta occidental como alimento básico de la dieta. Durante este tiempo, de forma espontánea y a medida que el trigo fue domesticado por las sociedades agrícolas, se han ido seleccionando variedades más resistentes a las plagas y a las condiciones climáticas, así como más productivas (Shewry, 2009).

Esta adaptabilidad ha contribuido al gran éxito del trigo en la dieta actual, pero esto solo no es suficiente para que sea uno de los cereales que domina gran parte de los cultivos del mundo. La característica clave que le ha dado una clara ventaja frente a otros cereales es la viscoelasticidad de las masas formadas con las harinas del trigo. Esta característica permite que sean moldeadas en un amplio rango de panes y productos de panadería, pasta y otros productos procesados. Estas propiedades dependen de las estructuras y las interacciones de las proteínas de reserva que forman juntas la fracción proteínica denominada gluten.

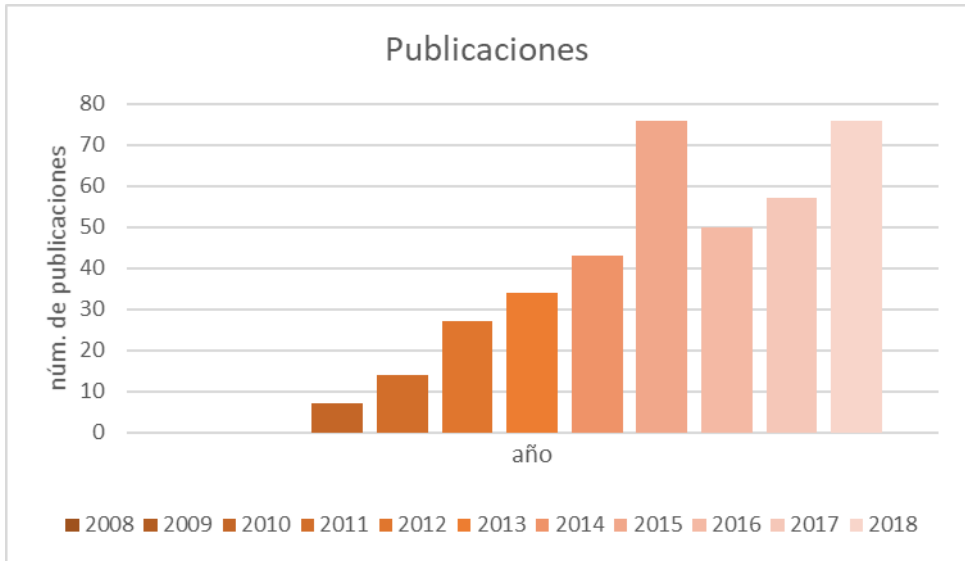
Las dos enfermedades mejor conocidas que están relacionadas con la exposición al gluten son la celiaquía o enfermedad celiaca (EC) y la alergia al gluten/trigo (AG). En ambas, la reacción al gluten está mediada por la activación de las células T en la mucosa gastrointestinal. La EC es una reacción autoinmune donde la predisposición genética juega un rol importante y está fuertemente asociada con antígenos leucocitarios de histocompatibilidad (HLA) de clase II conocidos como HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Por otro lado, la AG es una reacción alérgica adversa a las proteínas del trigo y los anticuerpos IgE juegan un rol central en su patogénesis. Ambas mejoran con la eliminación del gluten en la dieta, pero no todos los trastornos

relacionados con el gluten se pueden englobar en estas dos grandes patologías (Sapone *et al.*, 2012).

El aumento del consumo de un gran espectro de alimentos que contienen trigo y por tanto gluten como fracción mayoritaria de sus proteínas, podría haber contribuido a un incremento alarmante de la incidencia de los desórdenes gastrointestinales en los países industrializados. En un estudio realizado por Catassi *et al.* (2010), se observó que, durante los últimos 30 años, la prevalencia de la EC entre los adultos en los EEUU aumentó 5 veces, duplicándose aproximadamente cada 15 años. Los factores que participan en la pérdida de tolerancia al gluten podrían estar relacionados con la cantidad y la calidad de gluten vital añadido a las masas panarias, el tipo y duración de la fermentación de masa de trigo, el excesivo refinado del trigo, además de otros como el estado de la microbiota intestinal y sus cambios en el tiempo, infecciones entéricas, así como el estrés (Catassi *et al.*, 2010; Kasarda, 2013; Shewry, 2009).

El primer estudio que describe la "Sensibilidad al gluten no celiaca" (SGNC) fue realizado por Ellis y Linaker (1978), en el que exponen la resolución de los síntomas gastrointestinales persistentes en un paciente (en el que la enfermedad celíaca había sido excluida) con la adopción de una dieta libre de gluten. Unos años más tarde se publica la descripción de este trastorno en ocho mujeres adultas que, reportando dolores abdominales y diarrea crónica, sin evidencias de EC y biopsias normales, mejoraban de forma significativa con una dieta sin gluten reapareciendo estos síntomas cuando el gluten volvía a ser introducido (Cooper *et al.*, 1980). Desde entonces hasta el año 2009 no hay información científica sobre esta condición, año en el que se describe como un trastorno diferenciado a la EC y con diferente respuesta inmunitaria (Sapone *et al.*, 2010; Verdú *et al.* 2009).

A partir de 2010 un número creciente de trabajos científicos y estudios clínicos, que hacen referencia a esta condición, han confirmado la existencia de este trastorno (figura 1).



**Figura 1.** Tendencia del número de publicaciones respecto al SGNC en los últimos 10 años (elaboración propia).

En 2012 la comunidad científica enmarcó la SGNC dentro de los desórdenes relacionados con el gluten definiéndose de forma tan general como “aquellos casos de reacción al gluten, en donde se ha descartado tanto los mecanismos gastrointestinales autoinmunes como los alérgicos (diagnóstico por exclusión) y que desaparecen con una dieta sin gluten (DSG) y vuelven a reaparecer con su introducción” (Sapone *et al.*, 2012).

Así como la EC está claramente definida y que su principal mecanismo patogénico está relacionado con la disminución de la función de la barrera epitelial o aumento de la permeabilidad y con una predisposición genética, sin embargo, la

patogénesis de la SGNC está todavía sin definir claramente. De lo que sí hay consenso científico es que en la actualidad no existen biomarcadores claros para diagnosticar la SGNC, el único diagnóstico posible es de exclusión, una vez se obtienen resultados negativos en las pruebas para la diagnosis de la EC y la AG principalmente.

Ante la necesidad de estandarizar un procedimiento para su diagnóstico, en 2014, la *3rd Internacional Expert Meeting in Gluten Related Disorders*, en Salerno, se consensó un procedimiento de confirmación y diagnóstico de la SGNC. Este protocolo consiste en dos etapas una vez descartadas la EC y la AG. En la primera se realiza un seguimiento al paciente con una DSG y deben mostrar al menos un 30% de disminución de los síntomas gastrointestinales. En la segunda se realiza un ensayo de doble-ciego cruzado de una semana de duración con gluten (Catassi *et al.*, 2015). En esta reunión se indicó el desconocimiento que existe de esta condición y la necesidad de definir biomarcadores que puedan identificar con claridad esta patología de otras como la EC en sus estadios más preliminares (Mash 1), el Síndrome del Intestino Irritable (SII) con predominio de diarrea y otras alteraciones del sistema gastrointestinal con el consumo de gluten. También se indicaron otros aspectos de interés relacionados con la sintomatología de la SGNC, como es la influencia del gluten, así como otros componentes del trigo, entre ellos, la familia de los inhibidores de la amilasa y tripsina (ATIS), los carbohidratos de cadena corta rápidamente fermentables (FODMAPS), o las aglutininas del germen del trigo (AGT), en la sintomatología de la SGNC.

Por este motivo, en estos años las investigaciones se han dirigido hacia poder identificar claramente unos biomarcadores, determinar su prevalencia, analizar el mecanismo por el cual hay una activación del sistema inmune y cómo influyen los componentes del trigo y otros alimentos, principalmente el gluten, en

su patogénesis. Se han llegado a discretos avances en este sentido, pero todavía se está lejos de conocer en profundidad este trastorno debido a la multitud de variables que se barajan y, por tanto, se está lejos de poder diseñar un tratamiento dietético basado en la evidencia.

## 1.1 Prevalencia

En la actualidad la epidemiología de la SGNC no se ha establecido debido a que los estudios realizados hasta el momento presentan fallos metodológicos. Las muestras no son homogéneas, además la mayoría de los estudios están basados en la tolerancia al gluten percibida por el paciente sin validación clínica, con el riesgo que los resultados estén solapados con otros desórdenes intestinales, como el SII, la Enfermedad Intestinal Inflamatoria (EII), la Enteritis Linfocitaria (EL) o fases iniciales de la EC.

Aun así, se presupone que la prevalencia de la SGNC es más elevada que la enfermedad celiaca (en torno al 1%) situándose en un rango del 0,55% y del 6% según los estudios más relevantes (DiGiacomo *et al.*, 2013; Sapone *et al.*, 2012). En la tabla 1 se presentan los principales estudios realizados que estiman la prevalencia de la SGNC.

**Tabla 1.** Estudios de prevalencia SGNC del año 2012 al 2018.

País de la muestra	Muestra	Prevalencia	Referencia
USA	5.896 adultos Realizado durante los años 2004-2010	Prevalencia: 6%	Sapone <i>et al.</i> , 2012

Tabla 1. Continuación.

País de la muestra	Muestra	Prevalencia	Referencia
USA	<b>7.762</b> adultos Realizado durante los años 2009-2010	A partir de un cuestionario se estima una prevalencia de <b>0.548%</b> Mayor en mujeres	DiGiacomo <i>et al.</i> , 2013
Italia	<b>12.255</b> pacientes (rango de 3 a 81 años) Realizado durante 2012-2013	Prevalencia: <b>3,2%</b> 84% mujeres Edad media 38 años	Volta <i>et al.</i> , 2014
Reino Unido	<b>1.002</b> adultos, 55% mujeres, edad media 39 años	Prevalencia: <b>12,1%</b> El <b>13%</b> se definen como sensibles al gluten en un cuestionario autocontestado, de ellos el <b>0,7%</b> se descarta por EC	Aziz <i>et al.</i> , 2014
Austria	<b>1.184</b> adultos mayores de 18 años, 53% mujeres	<b>7,3%</b> una vez excluida EC	Golley <i>et al.</i> , 2015
Italia	<b>548</b> adolescentes 14–18 años	Prevalencia: <b>2,9%</b>	Carroccio <i>et al.</i> , 2017
Italia	<b>1.114</b> niños con síntomas gastrointestinales	Prevalencia: <b>1%</b> una vez excluida EC y AG	FrancaVilla <i>et al.</i> , 2018

Puede presentarse a cualquier edad, aunque parece ser más frecuente en adultos que en niños (media de edad de 40 años), y como en otros desórdenes intestinales, la SGNC es más prevalente en mujeres que en hombres. Muchos de los casos son diagnosticados en la vejez o cuando, al cabo de los meses o años de un

seguimiento clínico, se han descartado otros trastornos sin que desaparecieran los síntomas propios de la SGNC (Lionetti *et al.*, 2015; Vojdani *et al.*, 2013).

En el trabajo de revisión de Molina-Infante *et al.* (2017), en donde se analizan aquellos estudios que han empleado ensayos doble-ciego aleatorio con placebo (ensayos DCACP), el 80% de las personas identificadas como sensibles al gluten, no podrían ser diagnosticados formalmente utilizando el protocolo establecido por los expertos de Salerno. Los estudios incluidos en el análisis varían en la dosis de gluten utilizado, en el tiempo la duración del ensayo y en la composición del placebo, además muchas de las personas que lo padecen tienen una respuesta nocebo. Este estudio cuestiona que el gluten sea el compuesto de la alimentación causante de los síntomas debido a las incoherencias encontradas. Además, pone en evidencia, al igual que en estudios anteriores, que continuar incluyendo al gluten en el nombre de la enfermedad cuando una alta proporción de las personas con sospechas de SGNC no tienen síntomas específicos con el gluten, no es adecuado. Se debería denominar sensibilidad al trigo no celiaca (STNC) de forma más general para que incluyese a otros posibles promotores de los síntomas como los FODMAPS y los ATIS. Aunque es más correcta esta terminología, seguiremos denominándola como SGNC durante todo este documento, como está reconocida por la comunidad científica hasta el momento.

Todo esto indica lo lejos que se está de determinar la prevalencia real. Se presupone que una vez se ha establecido un protocolo para la identificación de la SGNC según la reunión de Salerno, los estudios de prevalencia deberán ser más precisos. La dificultad estriba en que para identificar los “verdaderos” sensibles al gluten no celíacos se necesita un complejo seguimiento una vez se ha descartado la EC y a AG, que difícilmente es aplicable en el día a día de la actividad ambulatoria y

como se describen en varios trabajos, incluso en la investigación, por lo que el concepto de SGNC autodiagnosticada está ganando una mayor aceptación en los estudios realizados hasta ahora (Azid *et al.*, 2014b; Kabbani *et al.*, 2014).

Un último estudio realizado por Francavilla *et al.* en 2018, utilizaron los criterios de Salerno para identificar, en niños con síntomas gastrointestinales, la posible incidencia de la SGNC. Por primera vez se ha realizado un ensayo DCACP en niños (media de edad 11 años). Se verifica que este trastorno es real y está identificado, y aunque es menos común que en adultos, debería introducirse como protocolo este tipo de ensayo, ya que en más del 60% de los casos auto diagnosticados son descartados.

## 1.2 Sintomatología

Personas identificadas dentro de la patología de la SGNC son un grupo heterogéneo dado el gran espectro de síntomas que reportan. Los más característicos son los desórdenes gastrointestinales, como el dolor abdominal, los gases y la diarrea, así como los extraintestinales, cansancio, mente nublada y también, eccemas (tabla 2). Estos síntomas desaparecen cuando se administra una DSG. Los síntomas gastrointestinales se superponen con aquellos observados en el SII y que cursan con dolor abdominal, gases, diarrea y estreñimiento. En cuanto a los síntomas extraintestinales, el más común es la “mente nublada”, descrita como una sensación de letargo y vista borrosa que ocurre después de consumir comidas que contienen gluten, seguido por fatiga, dolor de cabeza, entumecimiento de piernas y brazos, depresión, ansiedad y anemia (Volta *et al.*, 2017)



**Tabla 2.** Síntomas de la SGNC (Volta *et al.*, 2012, 2017).

Síntomas SGNC	Prevalencia
<b><i>Gastrointestinales</i></b>	<b>96%</b>
Dolor abdominal	77%
Gases	72%
Diarrea	40%
Estreñimiento	18%
<b><i>Extraintestinales</i></b>	<b>97%</b>
Mente nublada	42%
Cansancio	36%
Eccemas	33%
Dolor de cabeza	32%
Dolor articular y muscular	28%
Entumecimiento piernas y brazos	17%
Depresión	15%
Anemia	15%

En aproximadamente el 47% de las personas que padecen SGNC coexiste con el SII, y el 35% han tenido un diagnóstico previo de intolerancias alimentarias como la fructosa y la lactosa, más del 20% a metales, otros alimentos o alérgenos (ácaros, polen, pelo de gato/perro, gramíneas). Los estudios revisados, revelan que estos pacientes muestran signos de malabsorción con niveles bajos de ferritina (16-23%) y vitamina D (11-16%) y deficiencia de folato (7-11%). Otro aspecto relevante es que la SGNC es frecuente en familiares de primer o segundo grado afectados por EC (12-18%) (Aziz *et al.*, 2014b; Carroccio *et al.*, 2012; Golley *et al.*, 2015; Volta *et al.*, 2014).

Una SGNC no diagnosticada y sin un tratamiento dietético adecuado se ha relacionado con diversas patologías del tipo neurológico (esquizofrenia, autismo, depresión), reumáticas (fibromialgia, espondiloartropatías y enfermedades autoinmunes sistémicas) e intestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa) (Isasi *et al.*, 2016; Peters *et al.*, 2014; Porcelli *et al.*, 2014). Recientemente, se le ha asociado con el síndrome de Gilles de la Tourette (Rodrigo *et al.*, 2018) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Complicaciones de la SGNC.

<b>Posibles complicaciones:</b>
<b>Neurológicas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Esquizofrenia</li><li>- Autismo</li><li>- Cambios de humor</li><li>- Depresión</li><li>- Síndrome de Gilles de la Tourette</li></ul>
<b>Reumáticas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Fibromialgia</li><li>- Espondiloartropatías</li><li>- Enfermedades autoinmunes sistémicas</li></ul>
<b>Intestinales</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Enfermedad de Crohn</li><li>- Colitis ulcerosa</li><li>- Linfomas</li><li>- Neoplasias gastrointestinales</li></ul>

## 1.3 Biomarcadores

En la actualidad todavía no existen unos biomarcadores fiables, la única prueba fiable para identificar sujetos con SGNC es utilizando el procedimiento de

acuerdo con el criterio de Salerno, procedimiento lento y complejo para su aplicación práctica.

En los últimos años se han utilizado diferentes marcadores biológicos, tratando de encontrar aquel idóneo para su identificación. El primero que se utilizó fueron los anticuerpos antigliadina (AGA) de la clase IgG, dado que 50% de las personas que padecen SGNC dieron positivo (Carroccio *et al.*, 2012; Sapone *et al.*, 2011; Volta *et al.*, 2012; Volta *et al.*, 2014; Volta *et al.*, 2016). El problema es que no es específico de la SGNC, se detecta también en pacientes con EC, en otros desórdenes relacionados con el gluten y también en personas sanas. Este indicador, además, desaparece muy rápidamente una vez que se ha eliminado el gluten de la dieta, al mejorar los síntomas (Caio *et al.*, 2014).

Los resultados de un estudio demuestran que las proteínas del trigo en contacto con las células mononucleares de sangre periféricas (PBMC), provocan una sobreactivación de las citoquinas proinflamatorias CXCL10. El nivel de esta activación depende de la variedad de trigo de donde se han extraído las proteínas y es independiente del contenido de gluten de la misma. La respuesta de cultivos de células mononucleares de sangre periféricas (PBMC) obtenidas de pacientes con SGNC al contacto de proteínas del trigo, podría ser un posible biomarcador (Valerii *et al.*, 2015).

Otro estudio más reciente, indica que los anticuerpos AGA-IgA están vinculados con la EC mientras que los anticuerpos AGA-IgM están relacionados con la SGNC y son indetectables para personas sanas. Se identificaron varias proteínas séricas como potenciales marcadores para la SGNC observándose un aumento de los niveles en suero de la CD14 soluble y de la proteína fijadora del lipopolisacárido (LBP) en comparación con pacientes celíacos. También se encontraron niveles altos de

proteína transportadora de ácidos grasos (FABP2) en las personas que padecen SGNC al igual que en la EC, proteína que está relacionada con una respuesta sistémica del sistema inmunitario. Según los autores, todos estos indicadores sugieren que existe un daño en la integridad de la barrera intestinal y una translocación microbiana incrementada, marcadores que se normalizan después de una DSG (Uhde *et al.*, 2016).

La SGNC no se ha correlacionado con ningún marcador genético propios de la EC, patología que afecta a individuos genéticamente predispuestos con los alelos HLA-DQ2/HLA-DQ8. El alelo HLA-DQ2 está presente en 90-95 % de las personas celiacas mientras el 5-10 % restante presenta el alelo HLA-DQ8. En la SGNC estos haplotipos son positivos solo en el 50%, presentándose en el 30-40% de la población general (Aziz *et al.*, 2014; Kabbani *et al.*, 2014; Sapone *et al.*, 2010, 2011; Volta *et al.*, 2012). Únicamente un estudio ha situado la presencia de los haplotipos HLA-DQ2/8 por encima del 70% en personas afectadas por la SGNC (Carroccio *et al.*, 2012).

Hasta que se determine un marcador biológico para la SGNC, la única prueba que puede ayudar a identificarla son los ensayos DCACP, prueba larga y costosa y que está a expensas de efectos placebo y nocebo. En dos estudios recientes, se observó que más del 80% de las personas reclutadas para el ensayo DCACP, con síntomas gastrointestinales con el consumo de alimentos con gluten y en los que se habían descartado la EC y la AG, no podían considerarse formalmente diagnosticados como SGNC. El 40% tuvo una respuesta nocebo y solo el 16% mostraron síntomas específicos de sensibilidad al gluten, alcanzando el 30% cuando se realizaba con el trigo completo, indicando que el ensayo DCACP no es el mejor ensayo para identificar la SGNC. Además, como en otros muchos estudios, surgen dudas de cuál es el rol del gluten en activar la respuesta de la enfermedad (Molina-

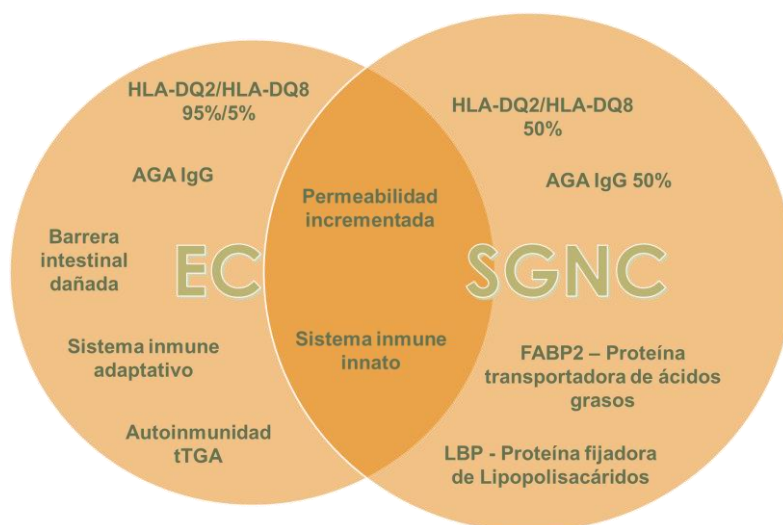
Infante *et al.*, 2017). En la tabla siguiente se recogen todos los indicadores analizados en pacientes sensibles al gluten frente a la respuesta de pacientes con EC.

**Tabla 4.** Biomarcadores para la EC y para la SGNC (Volta *et al.*, 2012; Uhde *et al.*, 2016).

Biomarcador	Enfermedad Celiaca	Sensibilidad al Gluten no Celiaca
<b>Serología</b>		
Anti-gliadina deaminada TG2	Positivo	Negativo
Anti-gliadina deaminada IgG	Positivo	Negativo
Anti-gliadina deaminada IgA	Positivo	Negativo
Anti-gliadina nativa IgG	Positivo	Positivo (50%)
Anti-gliadina nativa IgA	Positivo	Negativo
Anti-gliadina nativa IgM	Negativo	Ligeramente positivo
Anticuerpos IgM a flagelos bacterianos	Negativo	Positivo
<b>Histología duodenal</b>	Positiva	Negativa o con un número moderado de linfocitos intraepiteliales
<b>Haplotipos HLA (DQ2-DQ8)</b>	Presente (95 – 5%)	Ausente/presente 50%
<b>Ensayos IgE y test cutáneos frente al trigo</b>	Negativo	Negativo
<b>Análisis de otras proteínas en sangre</b>		
FABP2 – Proteína transportadora de ácidos grasos	Niveles no significativos	Positivo
LBP - Proteína fijadora de Lipopolisacáridos	Niveles no significativos	Positivo

## 1.4 Patogénesis

En la actualidad, no está claro qué componentes de la alimentación actual pueden iniciar la patogenia de las personas que padecen SGNC, la única hipótesis cierta es que una dieta libre de alimentos que contienen gluten/trigo mejora sustancialmente los síntomas, reapareciendo cuando vuelven a introducirse. Los datos que existen hasta la fecha sobre su patogénesis sugieren que los mecanismos que están involucrados en la EC y en la SGNC son diferentes, pero existen procesos comunes a ambas (Leonard *et al.*, 2017).

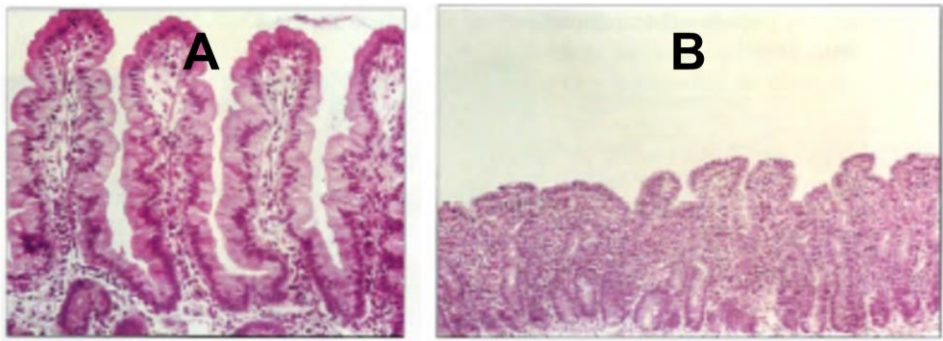


**Figura 2.** Mecanismos involucrados en la EC y en la SGNC (Leonard *et al.*, 2017).

Dada la posible similitud con la EC en relación con el posible rol del gluten en su patogénesis, la función barrera de la mucosa intestinal y el posible rol del sistema inmunitario innato frente al adaptativo han sido dos aspectos ampliamente analizados en la SGNC y comparados con la EC.

### 1.4.1 Función barrera intestinal

En la EC está claramente establecido que hay una pérdida de la función barrera de la mucosa intestinal y que esta, representa el mecanismo clave para el desarrollo de la autoinmunidad por el continuo paso de antígenos a través del epitelio intestinal. La atrofia del borde en cepillo del enterocito es la característica histológica más llamativa en la EC e implica un daño intestinal severo. Además, es fácilmente reconocible tanto por endoscopia como por cortes histológicos (Pelegrí *et al.*, 2013).



**Figura 3.** Mucosa duodenal de un paciente control no-EC (A) y de un paciente con enfermedad celiaca al diagnóstico (B) donde se muestra una lesión con atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas al microscopio óptico (Rodrigo y Peña, 2013).

En la SGNC no está claro que haya un componente autoinmunitario, aunque sí que se ha confirmado que existe una permeabilidad intestinal incrementada similar a la que tienen las personas que padecen la EC. En los primeros estudios realizados para ver el estado de la barrera intestinal, se observó que sujetos con sensibilidad al gluten no presentaban cambios en la permeabilidad (Sapone *et al.*, 2010, 2011). En este trabajo se realizó además un análisis de la expresión de

proteínas reguladoras de la permeabilidad intestinal: claudinas (CLDN), ocludinas (OCLN) y zonulinas (ZO), proteínas críticas para mantener la adhesión entre las células de las monocapas del epitelio intestinal. Se observó un incremento de la expresión de la proteína CLDN-4 en muestras de biopsias duodenales de pacientes sensibles al gluten frente a las personas que padecen la EC, indicativo de que estos sujetos podrían tener una mucosa menos permeable que aquellos con EC.

Posteriormente estos ensayos se repiten en otro estudio mejor diseñado, DCACP, en personas que reportan síntomas de SGNC y no presentan la EC, en el que no se observan cambios significativos en la permeabilidad intestinal, ni ningún indicador anormal relacionados con la EC (Biesikiński *et al.*, 2011).

Estudios más recientes han documentado que la permeabilidad del intestino delgado está incrementada en pacientes con SGNC con test de permeabilidad intestinal con lactulosa/manitol y mediante el análisis de los niveles de zonulina intestinales y en suero, sugiriendo que existe un desajuste de las uniones estrechas intestinales. Uno de ellos publicado en 2015, utiliza la técnica de ensayo celular TEER y analiza los cambios de permeabilidad del intestino de biopsias de varios grupos de sujetos (EC, SGNC, EC en remisión y grupo de control). Todos los grupos presentan una permeabilidad intestinal incrementada después de la exposición a la gliadina del gluten. Tanto las personas con SGNC y los EC activa muestran un mayor incremento en la permeabilidad intestinal que el grupo de EC en remisión (Hollon *et al.*, 2015). En 2016 se publica un trabajo muy relevante donde se observa que las personas que padecen SGNC tienen incrementados los niveles circulantes de la proteína transportadora de ácidos grasos (FABP2), que indican una activación del sistema inmune y una integridad comprometida del epitelio intestinal.



Se observaron niveles de esta proteína significativamente elevados en los individuos afectados por la SGNC frente al resto de grupos analizados (Uhde *et al.*, 2016).

La endomicroscopía confocal por láser (ECL) es una modalidad endoscópica novedosa, que permite obtener imágenes de muy alta resolución de la mucosa del tracto gastrointestinal. Con este endoscopio se consiguen obtener imágenes de daños estructurales y funcionales del epitelio intestinal a tiempo real sin necesidad de realizar biopsias (Pellisé, 2010). Esta técnica podría ser muy interesante para identificar el posible daño en la mucosa duodenal y para entender la patogénesis de la SGNC (Carrocio, 2016). Un estudio realizado sobre pacientes diagnosticados con SII observó con esta técnica cambios en la mucosa duodenal (roturas epiteliales, aumento de espacios intervillosos y del número de linfocitos intraepiteliales (LIEs)) al cabo de los 5 minutos de la exposición directa con los cuatro mayores alérgenos alimentarios (leche de vaca, trigo, levadura y soja), demostrando la mejoría de la mucosa duodenal cuando eran excluidos de la dieta (Fritscher-Ravens *et al.*, 2014).

### 1.4.2 Rol del sistema inmunitario innato frente el adaptativo

La inmunidad innata constituye la primera barrera de defensa frente a la infección por agentes patógenos. Su inespecificidad la hace eficaz frente a un gran número de agentes patógenos. Cuando esta no es capaz de detener el proceso infeccioso, se instaura la enfermedad, al tiempo que la inmunidad específica adaptativa comienza a desarrollarse. Con la ayuda de la inmunidad específica adaptativa termina por controlarse la infección y la enfermedad remite. El sistema inmunitario adaptativo adquiere memoria inmunológica, lo que significa que ante una posterior reinfección, reacciona muy rápidamente contra el agente infeccioso,

bloqueando su acción y/o destruyéndolo. Aunque la inmunidad innata adaptativa tiene un rol fundamental en el desarrollo de la EC parece que la SGNC está relacionada principalmente con la activación de la respuesta innata (Castillo *et al.*, 2015).

El principal mecanismo patogénico de la EC está vinculado con la activación de las células T en la mucosa gastrointestinal, es una reacción autoinmune donde la predisposición genética juega un rol importante y donde la inmunidad innata como adaptativa participan en su desarrollo. La fracción de las gliadinas del gluten, especialmente la  $\alpha$ -gliadina y la  $\gamma$ -gliadina, es mayoritariamente la responsable de los efectos de la EC (Castillo *et al.*, 2015). Como resultado de una proteólisis incompleta del gluten, los péptidos son transportados a través del epitelio y desaminados por una enzima, la transglutaminasa tisular (TG2) y procesadas por células presentadoras de antígenos (CPA). Los linfocitos T CD4 que responden a los péptidos desaminados por la TG2 y presentados por las moléculas HLA-DQ2 o DQ8, activan la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, que a su vez culmina en una lesión inflamatoria del intestino delgado y en una atrofia de las vellosidades.

En un principio, se consideró que estas fracciones podría ser una de las promotoras de la sintomatología de la SGNC, sin embargo, numerosos estudios ponen en duda si realmente son estas proteínas las que desencadenan los síntomas de la inmunidad innata en la SGNC (Rodrigo y Peña, 2013).

Aunque la patogénesis de la SGNC está lejos de ser descrita, hay evidencias que sugieren que coexiste un estado de activación inmunitaria sistémica en conjunción con un epitelio intestinal comprometido (Uhde *et al.*, 2016; 2018). La participación del sistema inmunitario innato está demostrada en diversos estudios, uno de los más representativos encontró una expresión acentuada de los receptores

tipo Toll TLR2 y en menor medida los TLR1 y TLR4, frente a la EC en biopsias intestinales de ambos grupos, aunque se realizó sobre sujetos que se autodenominan sensibles al gluten y no por discriminación con un ensayo DCACP (Sapone *et al.*, 2011).

Los receptores tipo Toll (TLRs) tienen un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria innata. En los seres humanos comprenden una familia de diez receptores con especificidad para diferentes patógenos (bacterias, hongos o virus), estos envían señales a los macrófagos para que se activen y secreten citoquinas proinflamatorias y otras sustancias que atraen a células efectoras.

Concretamente los TLR2, TLR1 y TLR4 son receptores que reconocen un tipo muy específico de componentes estructurales. Por ejemplo, los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) son reconocidos por el TLR4; el TLR2 en combinación con TLR1 o TLR6 es capaz de reconocer peptidoglicanos de bacterias Gram positivas. La unión del ligando al dominio extracelular de los TLRs inicia una compleja cascada de señal-transducción, que finalmente conduce a la activación del factor de transcripción del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y al aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Miller *et al.*, 2005).

Otros estudios abren la posibilidad de que haya un pequeño componente de la inmunidad específica adaptativa en la patogénesis de la SGNC, ya que un número de pacientes mostraron un incremento de las células T CD3+ intraepiteliales comparado con los controles después de la ingesta de gluten, aunque en número muy inferior al de aquellos con EC (Brottveit *et al.*, 2013). La falta de células T reactivas al gluten y la falta de asociación con HLA, sugiere que el sistema

inmunitario no actúa de la misma forma que en la EC, hecho que podría explicar por qué la SGNC no esté acompañada con un fenómeno significativo autoinmune. Brottveit *et al.* (2013) sugieren la posibilidad de que la SGNC implique la activación de la respuesta innata, pero con fallo en la respuesta adaptativa posterior.

### 1.5 Iniciadores de la SGNC

La ingestión de alimentos activa una cadena de mecanismos que permiten al sistema digestivo realizar una serie de tareas complejas de digestión y absorción de nutrientes, así como de la expulsión de los restos no asimilados. Bajo circunstancias normales, el intestino responde con un sistema regulado de interacciones que permiten mantener sus funciones y su homeostasis de forma apropiada. Hay factores dietéticos que pueden ser perjudiciales en determinadas circunstancias y en consecuencia causar reacciones adversas a través de múltiples mecanismos. Las más importantes derivan del consumo de la leche, el huevo, el trigo, la soja, los cacahuets, los frutos secos, el pescado y los mariscos y se pueden clasificar en dos grupos: intolerancias e hipersensibilidad (Nwaru *et al.*, 2014). En este último grupo se incluirían las alergias alimentarias mediadas por anticuerpos IgE y las hipersensibilidades alimentarias no mediadas por IgE. Tanto las intolerancias como las hipersensibilidades se caracterizan por provocar reacciones adversas cuando se consume un determinado alimento. La hipersensibilidad es una reacción en la que está involucrado el sistema inmunológico mientras que en la intolerancia este no interviene (Shepherd y Gibson, 2013).

Las alergias alimentarias se dan cuando el sistema inmunológico no funciona correctamente, confundiendo una sustancia inocua como si fuera una

amenaza provocando una serie de reacciones en cadena, produciendo anticuerpos u otras células que provoca la segregación de sustancias químicas (por ejemplo, histamina) que son las que producen los síntomas. Las alergias en las que intervienen anticuerpos del tipo IgE, habitualmente sus reacciones son inmediatas con síntomas cutáneos, respiratorios, gastrointestinales y anafilaxia (Nwaru *et al.*, 2014).

En las hipersensibilidades que no intervienen los anticuerpos IgE (o alergias no IgE mediadas), no se tienen definidos los mecanismos inmunológicos con tanta precisión y pueden actuar otros anticuerpos y/o células como defensa contra el alérgeno. Se producen normalmente frente a proteínas de alto peso molecular, como la proteína de la leche y el gluten. Los síntomas tardan en aparecer (incluso días) y pueden ser crónicos, llegando a afectar al estado nutricional (DeGeeter y Guandalini, 2018).

Una intolerancia alimentaria se da cuando el cuerpo no puede digerir correctamente un alimento o uno de sus componentes, bien por la incapacidad de generar alguna enzima que facilite la digestión de un determinado alimento, como es la intolerancia a la lactosa o a la fructosa (fallos en las hidrolasas específicas), o bien por otras causas (farmacológicas, metabólicas o indeterminadas). Cuando se padece una intolerancia, se puede ingerir pequeñas cantidades sin demasiados problemas (DeGeeter y Guandalini, 2018).

Tanto la EC y la SGNC se deberían tratar dentro del grupo de hipersensibilidades no mediadas por anticuerpos IgE, dado que el sistema inmunológico está alterado en ambas patologías, aunque en la SGNC podría haber un componente de intolerancia alimentaria dado que parece ser que hay mejora con la reducción en la dieta de FODMAPs (Biesiekierski *et al.*, 2013). Debido a la dificultad hasta ahora de hacer estudios clínicos con grupos de pacientes que realmente

presenten SGNC se desconoce qué componente de la dieta desencadena los síntomas de esta patología.

Tres componentes son los que actualmente están en discusión: el gluten, al igual que ocurre en la EC, los ATIs, como iniciadores de la inmunidad innata y adaptativa, y los FODMAPs, concretamente los fructanos como inductores de los síntomas intestinales, aunque no se puede descartar que otros componentes de la alimentación actual puedan estar contribuyendo a los síntomas de la SGNC como por ejemplo las AGT (figura 4).



**Figura 4.** Posibles efectos de los diferentes componentes del trigo que contribuyen a la sintomatología de la SGNC (De Punder y Pruimboom, 2013; Fasano *et al.* 2015; Volta *et al.* 2017).

La fracción de las gliadinas del gluten es mayoritariamente la responsable de los efectos de la EC, especialmente la  $\alpha$ -gliadina y la  $\gamma$ -gliadina ya que la mayoría de las células T específicas de la HLA-DQ2 o HLA-DQ8 derivadas de las biopsias de

intestino delgado de las personas con celiacía, parecen reconocerla (Fasano, 2011). La rápida mejora de las personas que padecen SGNC a la eliminación de los alimentos que contienen gluten en la dieta, sugiere a priori que sea principal factor alimentario causante de este trastorno. La primera vez que se describió esta patología fue en un grupo de pacientes con diarrea crónica sin vinculación con ninguna patología conocida, sin tratamiento efectivo y sin indicadores característicos de la EC, se les trató con una DSG a la que respondieron inmediatamente con una mejoría en su sintomatología (Cooper *et al.*, 1989). Fue desde entonces que se cuñó el nombre de SGNC y se comenzaron a emplear ensayos DCACP para diferenciar la SGNC frente a otras patologías, como la EC y el SII, en donde se ha utilizado el gluten concretamente como harina de trigo o como gluten purificado, adicionado a diversos alimentos.

Un estudio de 2006, realizado por Thomas *et al.*, analiza el rol de la respuesta inmune innata en la EC, llega a una importante conclusión que podría vincular esta respuesta con otras proteínas del trigo diferentes a la fracción de la gliadina del gluten: la gliadina digerida con pepsina-tripsina (PT-gliadina) no activa los receptores TLR2 ni los TLR4, y la respuesta inmune innata observada no es debida a una posible contaminación con el LPS utilizado como control. Por otro lado, en 2012, un trabajo realizado para conocer los factores desencadenantes de la activación inmune innata con el trigo describe el papel de los ATIs y concluye que estos son un potente estimulador de los TLR4 en el intestino y esto no sólo podría ser relevante para la EC, sino que es probable que tenga consecuencias para las personas que padecen SGNC y, posiblemente, para otras patologías gastrointestinales (Junker *et al.*, 2012; Schuppan *et al.*, 2015).

Los ATIs representan aproximadamente el 4% del total de la proteína del trigo y no se degradan con facilidad con las proteasas del intestino. Son proteínas

que participan en los mecanismos de defensa de los cereales frente a plagas y parásitos inhibiendo sus enzimas digestivas. El cultivo de trigo de alto rendimiento y altamente resistente a las plagas conduce a la selección automática de variedades con un alto contenido en ATIs, además hay diferencias importantes en cuanto a su cantidad entre distintas variedades del trigo. No solo la selección ha potenciado el aumento de los ATIs, los genes codificantes de estos inhibidores están considerados como útiles en ingeniería genética y, aunque no se estén comercializando, ya se han desarrollado plantas de trigo transgénicas con sobreexpresión de los ATIs. Además, estas proteínas son promotoras de diversas alergias, concretamente los ATIs son uno de los principales percusores del asma del panadero (Gómez *et al.* 1990).

Por otro lado, ha sido analizada la implicación de los FODMAPs en los síntomas de la SGNC. Varios estudios, incluidos algunos ensayos DCACP, señalan a los FODMAPs como posibles cofactores desencadenantes los síntomas intestinales del SII con predominio de diarrea y por tanto podrían ser también de la SGNC (Biesiekierski *et al.*, 2011, 2013; Volta *et al.*, 2016b). Los FODMAPs son carbohidratos de cadena corta que fermentan muy rápidamente y son muy poco absorbidos en el intestino delgado provocando un incremento del volumen de agua, la producción de gases y la motilidad intestinal, dolor abdominal y cambios en los hábitos intestinales (Catassi *et al.*, 2017; Gibson y Shepherd, 2005, 2009). Entre los FODMAPs se encuentran los fructanos, y es el trigo y otros cereales con gluten, el alimento que mayor aporte de fructanos en la dieta.

Por tanto, una DSG o reducida en gluten/trigo, es también baja en ATIs y en FODMAPs (Gibson y Shepherd, 2009; Zevallos *et al.*, 2017). Estos tres componentes podrían estar contribuyendo por vías diferentes, en los síntomas intestinales y extraintestinales de la SGNC (DeGiorgio *et al.*, 2016). Un estudio clínico



reciente en el que se analiza el efecto de una dieta baja en FODMAP frente a una DSG sobre los síntomas clínicos, el bienestar psicológico, la inflamación e integridad intestinal y la microbiota fecal, observaron que los síntomas gastrointestinales y psicológicos de las personas que padecen SGNC mejoraron después de consumir la dieta baja en FODMAPs. Sin embargo, una DSG resolvió aún más los síntomas clínicos en todos los casos, especialmente para el dolor abdominal, la diarrea y el estreñimiento, junto con una mejora significativa del bienestar subjetivo (Dieterich *et al.*, 2018).

Los componentes y mecanismos que inician los síntomas todavía no están descritos, es más, actualmente sigue estando en discusión y proponiéndose nuevas hipótesis que podrían involucrar nuevos actores como los LPS y la fosfatasa alcalina intestinal (FAI) (Leccioli *et al.*, 2017).

### 1.5.1 El gluten

Los cereales que contienen gluten han sido una parte importante de la dieta occidental, principalmente el trigo, debido en parte a sus características únicas por sus propiedades fisicoquímicas que permiten la preparación de masas de alta calidad y por su valor nutricional. En los últimos diez años, el consumo de alimentos que contienen gluten se ha asociado con diversas patologías, desde obesidad hasta carcinomas, aunque en realidad sólo hay una condición gastrointestinal en la que el gluten está relacionado claramente: la enfermedad celíaca, que afecta aproximadamente al 1% de la población en el mundo occidental (Brouns *et al.*, 2013; Koning, 2015).

El gluten representa el 80% del total de proteína del grano del trigo, y está presente en otros cereales como el centeno (*Secale cereale*), cebada (*Hordeum*

vulgare) y algunas variedades de avena (*Avena sativa*). Hay más de 10.000 variedades de trigo conocidas en todo el mundo, sin embargo, sólo unas pocas de ellas se utilizan para la producción de alimentos, especialmente el trigo duro (*Triticum durum*) tetraploide y trigo común (*Triticum aestivum*) hexaploide. Los trigos tetraploides, comparten los genomas A y B con el trigo común, entre ellos se encuentran el trigo emmer (*Triticum dicoccum*), trigo duro (*Triticum durum*), rivet (*Triticum turgidum*), y el trigo Khorasam o Kamut (*Triticum turanicum*) y proceden de la hibridación natural de dos especies diploides (Shewry, 2009). En la figura 5, se muestra la relación existente entre los diferentes cereales que contienen gluten y cómo la hibridación de diferentes especies diploides ha dado lugar al trigo actual o común.

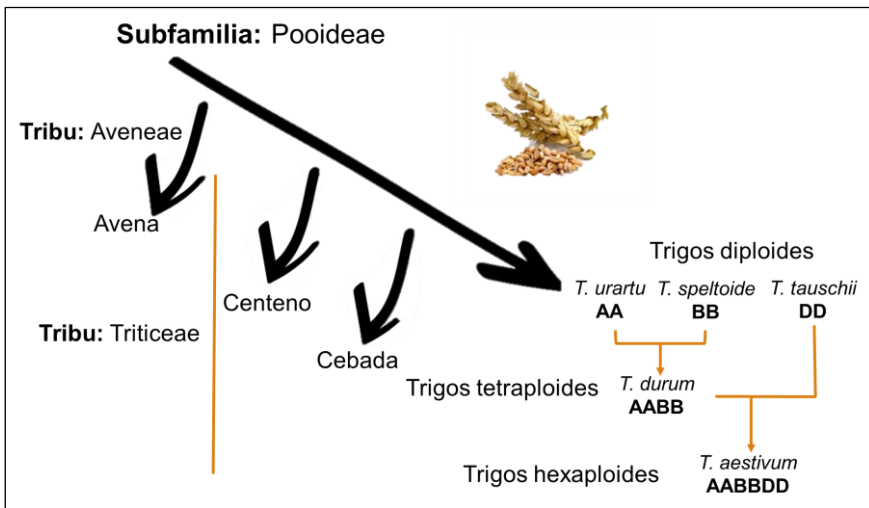


Figura 5. Evolución de las especies diploides de trigo hacia especies tetraploides y hexaploides por hibridación natural (Koning, 2015).

Debido a la presencia de dos y tres genomas en las variedades de trigo tetraploide y hexaploide respectivamente, estas producen más proteínas de gluten,

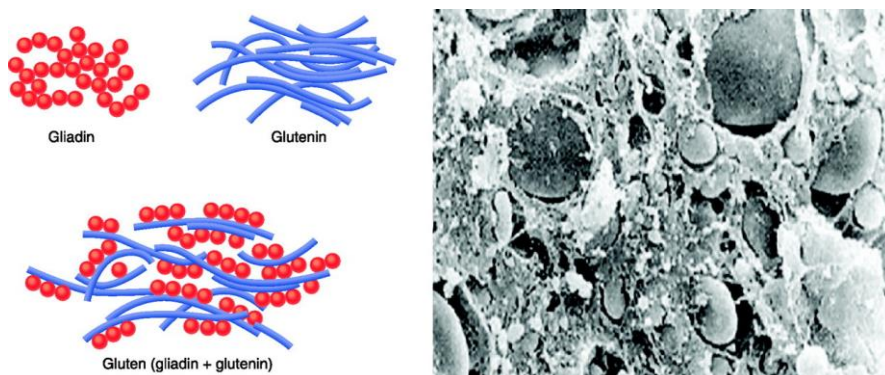
lo que favorece la producción de masas de alta calidad. Convencionalmente se ha utilizado la tecnología de reproducción para optimizar aún más el rendimiento de los cultivos durante miles de años (Koning, 2015).

Según su función en el cereal y sus relaciones moleculares y biológicas, las proteínas de los cereales se pueden dividir en tres grandes grupos: proteínas de reserva, proteínas estructurales y metabólicas, y proteínas de defensa. Aunque esta separación no es exhaustiva ya que en algunos casos pueden tener una combinación de roles (Mills *et al.*, 2004). El mayor grupo de proteínas de reserva son las prolaminas, normalmente nos referimos a ellas como gluten. Se puede dividir en proteínas de bajo contenido en azufre (las  $\omega$ -gliadinas de 40-50 kDa), prolaminas de alto peso molecular (HMW o subunidades de gluteninas de alto peso molecular (80-120 kDa) y proteínas de alto contenido en azufre ( $\alpha$  y  $\gamma$ -gliadinas, 30-49 kDa y las LHW o subunidades de gluteninas bajo peso molecular, 30-45 kDa). Están presentes en el endospermo de semillas de trigo, cebada y centeno, donde proporciona los nutrientes necesarios para germinar semillas (Shewry, 2009). En particular las gluteninas HMW y las gliadinas, son las más importantes para la formación de una masa de alta calidad con óptimas propiedades de horneado, siendo las gliadinas las que contienen la mayoría de los fragmentos tóxicos que causan síntomas en pacientes con EC (Koning, 2015).

Según la CE se entiende por gluten la fracción proteínica del trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas y derivados de los mismos, que algunas personas no toleran y que es insoluble en agua, así como en una solución de cloruro sódico de 0.5 M (Reglamento UE 828/2014). Desde el punto de vista de su uso alimentario, el gluten también puede ser definido como la masa gomosa que se obtiene cuando se lavan las masas de trigo para eliminar los gránulos de almidón

y los componentes solubles en agua. Dependiendo de la meticulosidad del lavado, el contenido en proteínas es del 75-85% y en lípidos del 5-10% en seco.

El gluten cumple un rol clave en la determinación de las propiedades panarias más importante del trigo confiriéndole la capacidad de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad. Estas propiedades las confiere la mezcla de las dos fracciones de proteínas, las gliadinas y las gluteninas (figura 6). Podríamos asemejar el gluten como un “pegamento de dos componentes”, las gliadinas se entenderían como plastificantes o solventes de las gluteninas (Fasano, 2011). Es necesaria una mezcla de ambas fracciones para conseguir la viscoelasticidad de las masas y la calidad del producto final (Wieser, 2006).



**Figura 6.** Estructura del gluten: A la izquierda, fases que constituyen el gluten. A la derecha, imagen del gluten por microscopía electrónica (Fasano, 2011).

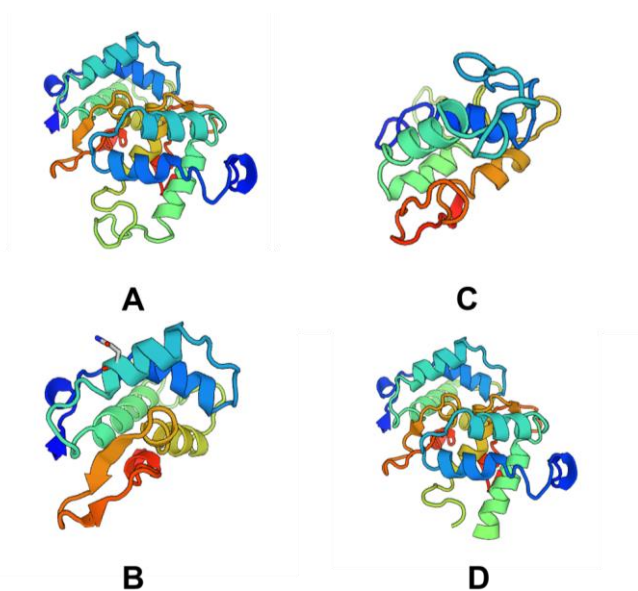
### 1.5.2 Inhibidores de la amilasa y/o la tripsina en cereales

La familia de los inhibidores de la amilasa y la tripsina (ATIs) comprende el grupo de proteínas de bajo peso molecular que tienen la habilidad de inhibir las amilasas y/o las proteasas de diferentes orígenes con un rol importante en la protección del cereal. Desde 1973, que se aislaron por primera vez en el trigo, su interés ha ido creciendo dada su implicación en diferentes alergias mediadas por las

inmoglobulinas IgE (Gómez *et al.* 1990; Pastorello *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2011; Silano *et al.*, 1973). Así mismo, se han hecho estudios con el fin de manipular estas proteínas por ingeniería genética en cultivos transgénicos y conseguir una resistencia mejorada a plagas y patógenos (Vasil *et al.*, 2007). Desde entonces se han publicado numerosos estudios para entender su estructura (Altenbach *et al.*, 2011; Carbonero *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2004), el mecanismo de inhibición sobre proteasas exógenas (Payan *et al.*, 2004) y los mecanismos de acción en el sistema inmunitario (Huebener *et al.*, 2015; Salcedo *et al.*, 2011).

Los granos del trigo y otros cereales como la cebada y el centeno contienen proteínas de la familia de los inhibidores de la tripsina y de  $\alpha$ -amilasas exógenas (externas a la propia planta). Estas han sido identificadas por extracción selectiva con mezclas de cloroformo/metanol, pero también se han extraído con soluciones salinas y mezclas de alcohol/agua (Pastorello *et al.*, 2007). Los ATIs del trigo son unidades de polipéptidos de 12-16 kDa que tienen una estructura secundaria con 4-5 puentes disulfuro intramoleculares, confiriéndole una estructura 3D esencial para darle una alta resistencia a la digestión humana por las proteasas gastrointestinales tripsina y pepsina. Todas los ATIs existentes en la naturaleza contienen 10 residuos de cisteína que son los que forman los puentes disulfuro presentes en su estructura (Carbonero *et al.*, 1999). Además de su función protectora en el cereal, los ATIs se acumulan en altos niveles en el endospermo del grano teniendo además funciones como proteína de reserva. En contraste con el gluten que contiene altos porcentajes de glutamina y prolina, las ATIs tienen una composición más balanceada de aminoácidos, con contenidos superiores de lisina. Por ello, estas proteínas compensan en parte las deficiencias de aminoácidos esenciales en las proteínas del gluten y constituyen una importante reserva de nutrientes para el crecimiento de las plantas y para la nutrición humana (Shewry, 2009).

En base a su estado de agregación se pueden encontrar tres tipos de ATIs activos contra las  $\alpha$ -amilasas de insectos, ácaros y mamíferos pero no contra las enzimas propias del cereal, son inhibidores monoméricos (1 subunidad o WMAI – Wheat Monomeric Amylase Inhibitor), también llamados proteínas 0.28, inhibidores homodiméricos (2 subunidades idénticas ó WDAI – Wheat Dimeric Amylase Inhibitor), referidos como proteínas 0.19 y 0.53, y heterotetraméricos (3 subunidades de las cuales 2 idénticas o WTAI – Wheat Tetrameric Amylase Inhibitor), referidos como proteínas CM dada su solubilidad en soluciones de cloroformo/metanol. Los inhibidores de la tripsina son monoméricos (WTI – Wheat Trypsin Inhibitor), también llamados inhibidores CMx (Altenbach *et al.*, 2011; Shewry y Cassey, 1999). En la figura 7 se representan las estructuras 3D de varios inhibidores.



**Figura 7.** Representación de las estructuras 3D de inhibidores de la familia de los cereales: Inhibidor de la amilasa y la tripsina del trigo A) 0.53 B) 0.28 C) CM3 D) 0.19 (University of Basel. Biozentrum. The Center fo Molecular Life Science, 2018).

En esta última década, numerosos estudios han tenido como objetivo identificar la diversidad de las secuencias de los distintos inhibidores que se encuentran en el trigo, tener esta información es esencial ya que inhibidores con un 98% de coincidencia en su secuencia pueden presentar diferentes especificidades contra  $\alpha$ -amilasas procedentes de diferentes insectos y mamíferos. Recientemente se ha podido codificar hasta 19 distintas proteínas de la familia de los inhibidores en un trigo comercial cultivado para la fabricación panaria (Butte 86). Entre ellos se incluyen doce inhibidores de  $\alpha$ -amilasas exógenas (dos monoméricas, cuatro diméricas y seis tetraméricas), dos inhibidores de  $\alpha$ -amilasas endógenas, cuatro inhibidores de tripsina y un inhibidor de la quimotripsina. Este estudio proporciona la información sobre el mecanismo de defensa y de las reacciones adversas con su consumo, además facilita la posible modificación de las proteínas, bien por procesos de mejoramiento de la planta o por vías de manipulación genética (Altenbach *et al.*, 2011).

En la actualidad no se están comercializando trigos transgénicos, si bien en el año 2009 ya habían desarrollados trigos capaces de introducirlos en el mercado y que en esta última década se han ido ampliando con diversas especificidades (Dunwell, 2013). Aunque la mayoría de estos proyectos no han pasado a su fase de producción debido a la gran presión social, en breve estarán en los campos. China está apostando fuertemente por el cultivo transgénico, pues ya en 2015 el gobierno chino dio el visto bueno a la siembra de varios cultivos experimentales de trigos genéticamente modificados, los cuales se empezaron a cultivar en el 2016, entre ellos se encuentran varios trigos resistentes a virus e insectos, con resistencia mejorada a la sequía y tolerantes a la sal y álcalis, trigo de alto rendimiento y con una utilización eficiente del nitrógeno y fósforo. Según los defensores de la modificación genética del trigo, esta vía es una alternativa bastante atractiva al uso

de pesticidas e insecticidas y puede contribuir no solo a la producción de variedades tolerantes a la mayor cantidad de plagas, ya que, además, su manipulación puede tener como objetivo disminuir su potencial alérgico, como es el caso de la modificación de la gliadina (Morandini, 2010). Por ejemplo, mediante ARN de interferencia se han eliminado los epítomos tóxicos presentes en los tres grupos de gliadinas del trigo común (Gil-Humanes *et al.*, 2010, 2014). Concretamente un grupo de investigación español del CSIC han demostrado que un nuevo tipo de trigo transgénico obtenido mediante esta tecnología, la línea E82, bajo en contenido de gliadinas, no tiene efectos adversos en los experimentos realizados en ratas. Este trigo cuenta con los mismos aportes nutricionales y comparables características de elasticidad y resistencia del trigo común (Ozuna y Barro, 2017).

El término de trigo engloba gran diversidad de variedades cultivadas y genotipos del género *Triticum*. Cada genotipo de trigo produce diferentes tipos y cantidades de gluten, fructanos y ATIs, ya que las regiones codificantes de las proteínas de reserva son altamente polimórficas, por ello a cada una de las variedades de trigo se le podría asignar un perfil de reactividad que indica la potencia y la cantidad de epítomos reactivos con su consumo (Kucek *et al.*, 2015). Incluso la expresión de las proteínas y los fructanos pueden cambiar en función del entorno en el que se cultiva. En épocas de sequía, los ATIs inhiben la degradación del almidón y facilitan la acumulación de este en las células que están relacionadas con el ajuste del balance osmótico protegiéndolas del daño por insectos. Se ha encontrado que el endospermo contiene altas cantidades de estos inhibidores (sobre un 11% del total de proteínas) para proteger el almidón de la degradación en las temporadas de pocas lluvias y están sobreexpresados en genotipos más tolerantes a la sequía (Gu *et al.*, 2015).



El trigo común, hexaploide, contiene tres genomas A, B y D derivados de sus ancestros. El trigo cultivado más antiguo es el einkorn o comúnmente trigo de escaña (*Triticum monococcum*), es diploide y solo contiene el genoma A. Las especies tetraploides comparten los genomas A y B con el trigo común. Los genes codificantes del inhibidor  $\alpha$ -amilasa están localizados en los cromosomas 3BS y 3DS del trigo, mientras que no hay evidencia de su existencia en el genoma A (Wang *et al.*, 2006). Se podría pensar que las especies tetraploides que no contienen el genotipo D producirán menos cantidad de ATIs, pero se observa que las variedades del trigo tetraploide, *Triticum emmer* y *Triticum durum*, inhiben totalmente la actividad de las  $\alpha$ -amilasas de saliva humana al mismo nivel o incluso de forma superior al trigo común dado que estos contienen el ATI tetramérico CM3 (Capocchi *et al.*, 2013). En el trigo einkorn, al no contener los genomas B y D, no se ha detectado ninguna inhibición de  $\alpha$ -amilasas humanas mediante inmunotransferencia ni mediante espectrometría de masas (Zoccatelli *et al.*, 2012).

### 1.5.3 Los FODMAPS

Los FODMAPs son un grupo heterogéneo de carbohidratos de cadena corta (oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos) y polioles contenidos en los alimentos, que son altamente fermentables y mal absorbidos por el intestino delgado. El acrónimo de FODMAP proviene de las siglas en inglés de “Fermentable Oligo-, Di- and Monosaccharides and Polyols”. Comprende la fructosa, lactosa, los fructo y galactoolisacáridos (fructanos y galactanos) y polioles (como el sorbitol, manitol, xilitol y maltitol). Esta agrupación fue acuñada por primera vez por Gibson y Shepherd (2005) de la Universidad de Monash (Melbourne, Australia) en un artículo donde sugerían la vincularon del consumo excesivo de FODMAPs en la dieta

occidental y la malabsorción de fructosa por el intestino delgado, con la enfermedad de Crohn. Según los autores, el continuo paso de estas sustancias y su fermentación rápida en el intestino conlleva a un incremento de la permeabilidad, un factor que predispone del desarrollo de la enfermedad de Crohn en sujetos genéticamente susceptibles.

Posteriormente estos mismos autores relacionaron la mejoría en los desórdenes gastrointestinales con un origen funcional, como el SII, con una dieta baja en FODMAPs. En este segundo trabajo, Gibson y Shepherd (2009) describen la base teórica, su eficacia y cómo se debe implementar. Esta es la dieta base que viene utilizándose para el tratamiento dietético del SII.

La ingesta elevada de FODMAPs aumenta la fermentación y agua, en el intestino delgado distal y en el colon proximal, induciendo la distensión luminal y provocando síntomas intestinales funcionales, como dolor, sensación de hinchazón, distensión abdominal y cambios en la motilidad intestinal (Barret *et al*, 2010; Shepherd *et al*, 2013). Por tanto, minimizando su ingesta se reducen estos síntomas, un efecto que puede revertirse si se reintroducen en la dieta.

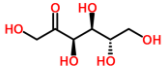
Los FODMAPS tienen tres propiedades funcionales (Gibson y Shepherd, 2009):

- **Baja absorción en el intestino delgado.** Esta mínima absorción es debido a la baja capacidad en los mecanismos de transporte a través del epitelio como puede ocurrir con la fructosa, reducida o nula actividad de las hidrolasas en el borde del cepillo en el caso de la lactosa, falta de hidrolasas específicas para romper las moléculas de fructanos y galactanos, o moléculas demasiado largas para tener un transporte por difusión como ocurre con los polioles.

- **Son moléculas muy pequeñas y muy activas osmóticamente.** Por ejemplo, la lactulosa, isómero de la lactosa, en exceso tiene un efecto laxante incrementando el líquido a nivel luminal y por tanto afectando a la movilidad intestinal.
- **Rápidamente fermentables por las bacterias del colon.** La velocidad de fermentación tiene relación con la longitud de los carbohidratos. Los oligosacáridos y azúcares se fermentan mucho más rápido que los polisacáridos como la fibra dietética soluble.

En las tabla 5, 6, 7 y 8 se detallan los diferentes FODMAPs, las fuentes alimentarias más importantes y su acción en el intestino.

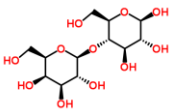
**Tabla 5.** Fructosa, fuentes alimentarias y acción en el intestino (Gibson y Shepherd, 2005; Royal Society of Chemistry, 2018).

Estructura química	Fuentes alimentarias	Acción en el intestino
	<p><b>Frutas:</b> Manzanas, cerezas, mango, sandía, grandes cantidades de zumos de frutas embotelladas o frutas secas</p> <p><b>Vegetales:</b> Espárragos, alcachofas</p> <p><b>Azúcares:</b> Miel, siropes</p>	<p>La fructosa es un azúcar simple y no requiere digestión, sin embargo, la absorción de la fructosa depende de la actividad de los transportadores de la glucosa que se encuentran en la pared del intestino delgado.</p> <p>La fructosa se absorbe de dos maneras diferentes dependiendo de cuánta glucosa tenga un alimento:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Glucosa &gt; o = fructosa en el alimento: la glucosa parece llevar la fructosa a través de la barrera del intestino delgado.</li> </ul>

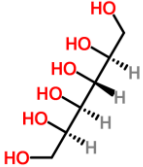
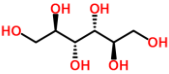
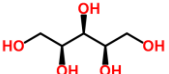
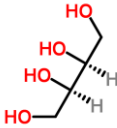
**Tabla 6.** Continuación

Estructura química	Fuentes alimentarias	Acción en el intestino
		<p>- Glucosa &lt; fructosa: se requiere un método de absorción alternativo. Este método de absorción es baja en algunos individuos y es la causa de la malabsorción de la fructosa. Alrededor del 30-40% de las personas sanas y con SII absorben mal el exceso de fructosa.</p>

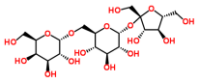
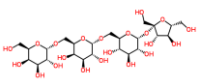
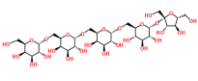
**Tabla 7.** Lactosa, fuentes alimentarias y acción en el intestino (Gibson y Shepherd, 2005; Royal Society of Chemistry, 2018).

Estructura química	Fuentes alimentarias	Acción en el intestino
	<p><b>Leche y yogures</b></p> <p><b>Productos lácteos:</b> quesos frescos (ej. ricotta, cottage); cremas, nata, helados</p>	<p>La lactosa es un disacárido compuesto por moléculas, glucosa y galactosa. Necesita ser descompuesta en unidades individuales por la hidrolasa lactasa antes de su absorción.</p> <p>Por lo tanto, la lactosa es sólo un FODMAP cuando hay niveles insuficientes de lactasa, que pueden estar influenciados por factores genéticos, la etnia (casi el 100% de los asiáticos y los hindúes tienen niveles bajos de lactasa) y trastornos intestinales.</p>

**Tabla 8.** Polioles, fuentes alimentarias y acción en el intestino (Gibson y Shepherd, 2005; Royal Society of Chemistry, 2018).

Estructura química	Fuentes alimentarias	Acción en el intestino
<p><b>Polioles</b></p> <p>Sorbitol</p>  <p>Manitol</p>  <p>Xilitol</p>  <p>Eritritol</p> 	<p><b>Frutas:</b> Manzanas, albaricoques, peras, moras, nectarinas, ciruelas, sandía</p> <p><b>Verduras:</b> Coliflor, champiñones, guisantes</p> <p><b>Bebidas:</b> zumos de manzana y pera</p> <p><b>Edulcorantes:</b> chicles sin azúcar, caramelos y chocolates y otros productos alimenticios edulcorados.</p>	<p>Son alcoholes derivados de distintos azúcares. Los más comunes en la dieta son el sorbitol y el manitol.</p> <p>Su absorción es lenta a través de la barrera intestinal, sólo alrededor de un tercio de lo que se consume es realmente absorbido.</p> <p>Los polioles son sustancias cristalinas de sabor ligeramente dulce a muy dulce.</p> <p>Debido a su sabor dulce y a su bajo poder calórico son cada vez más usados por la industria alimentaria como edulcorantes bajos en calorías en productos "sin azúcar", especialmente caramelos y chicles. También se encuentran de forma natural en diversos alimentos.</p>

**Tabla 9.** Oligosacáridos, fuentes alimentarias y acción en el intestino (Gibson y Shepherd, 2005; Royal Society of Chemistry, 2018).

Estructura química	Fuentes alimentarias	Acción en el intestino (Gibson y Shepherd, 2005)
<p><b>Oligosacáridos</b></p> <p>Rafinosa</p> 	<p><b>Cereales:</b> Centeno y productos de centeno, trigo y productos de trigo, cebada y sus productos.</p> <p><b>Frutas:</b> Melocotones, caqui, sandía</p>	<p>Éstos comprenden los fructanos (fructo-oligosacáridos o FOS), que se componen de cadenas cortas de fructosa con una glucosa en el extremo, y los galacto-oligosacáridos (GOS), que son cadenas cortas de unidades de sacarosa y galactosa.</p>
<p>Estaquirosa</p> 	<p><b>Verduras:</b> Alcachofas, puerro, legumbres; cebolla, remolacha, hinojo, anacardos, ajo y sales de ajo.</p> <p><b>Otros:</b> Inulina (a menudo llamada fibra en suplementos y productos nutricionales)</p>	<p>Estos oligosacáridos no pueden ser digeridos ya que los humanos no disponemos de la enzima <math>\alpha</math>-galactosidasa para descomponerlos. Por lo tanto, no son absorbidos en el intestino delgado por nadie y pueden causar problemas en personas con SII.</p>
<p>Verbascosa</p> 		<p>La cocción generalmente reduce el contenido en GOS de las legumbres.</p>

Los FODMAPs desencadenan síntomas gastrointestinales: distensión lumínica debido a efectos osmóticos, atrayendo agua al lumen intestinal, provocando fermentación bacteriana, lo que resulta en una producción excesiva de

gas, pero como tal, el sistema inmunológico no está involucrado en la generación de síntomas (Shepherd *et al*, 2013). Por ello, aunque la intolerancia a los fructanos, contenidas en el trigo y otros cereales, y otros FODMAPs, puede contribuir a la SGNC, sólo pueden explicar los síntomas gastrointestinales, pero no la activación del sistema inmune ni los síntomas extraintestinales observados en pacientes con SGNC, como disfunción neurológica, trastornos psicológicos, fibromialgia y erupción cutánea (Aziz *et al.*, 2015). Por lo tanto, es poco probable que sean la única causa de la SGNC.

### 1.5.4 Aglutininas del germen del trigo

Las AGT son un tipo de lectina que se encuentran en el germen de los granos de trigo. El término de lectina abarca una amplia gama de proteínas de origen vegetal y animal capaces de unirse de forma más o menos específica a moléculas de azúcares, formando uniones muy similares a las de las enzimas con sus sustratos o los anticuerpos por sus respectivos antígenos. En las plantas están presentes especialmente en semillas, y actúan como mecanismo de defensa frente a otras plantas y hongos. Gracias a su habilidad de unirse y ser endocitadas por las células epiteliales del intestino delgado, están consideradas como nutricionalmente tóxicas para la mayoría de los animales (Puzstai *et al.*, 1993).

La mayoría de las lectinas son resistentes al calor y a los efectos de las enzimas digestivas, y se ha demostrado tanto en ensayos *in vitro* e *in vivo* que son capaces de unirse a diversos tejidos y órganos en los humanos, como la superficie del intestino, pudiendo participar en la activación del sistema inmune y en el aumento de la permeabilidad intestinal (de Punder *et al.*, 2013). La mayoría de los estudios que analizan la respuesta al consumo de lectinas, lo han realizado sobre

biopsias y modelos murinos con lectinas nativas, muy pocos de ellos sobre humanos y menos con alimentos cocinados que contengan lectinas.

Su actividad proinflamatoria ha sido estudiada en diversos cereales como el trigo, cebada, centeno, avena, maíz y arroz, aunque la lectina de los granos del trigo es la que más se ha estudiado. La mayor concentración de lectinas de trigo se encuentra en el germen hasta 0,5 g/kg. Además, el germen de trigo no procesado, como el muesli, contiene mayor cantidad de AGT activas que en los alimentos procesados (Puzstai *et al.*, 1993).

Las AGT se unen al ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), que es el ácido siálico predominante en los humanos. Esta unión permite que se adhiera a las superficies de las células del epitelio intestinal y facilita la entrada de otras células al lumen intestinal provocando una respuesta proinflamatoria (Dalla *et al.*, 2009). Los ácidos siálicos son una amplia familia de azúcares de nueve carbonos que se encuentran normalmente en las posiciones terminales de muchas superficies y su función es el reconocimiento del sistema inmunitario propio de los vertebrados, pero también pueden ser usados como punto de unión para los patógenos extrínsecos y toxinas moleculares (de Punder *et al.*, 2013).

Estudios con biopsias y modelos murinos han demostrado que las AGT inducen a las células proinflamatorias, aunque los datos en humanos indican que la influencia de las AGT en los marcadores inflamatorios es nula. También, se han encontrado anticuerpos anti AGT en el suero de individuos sanos, siendo en pacientes celíacos los niveles mucho más altos comparados con otros desórdenes gastrointestinales. Estos anticuerpos no reaccionaron de forma cruzada con los antígenos del gluten y se planteó la hipótesis de que desempeñaban un papel importante en la patogénesis de la EC. Sin embargo, la respuesta inmunológica en



pacientes con enfermedad celíaca no es significativa ni son relevantes en la etiología de la enfermedad (Sollid *et al.*, 1986). El efecto de las AGT se ha reevaluado ampliamente y se ha demostrado que no tienen relación con la respuesta autoinmune, aunque no hay estudios de su posible efecto en la SGNC donde este componente genético está descartado (Van Buul *et al.*, 2013). Hasta el momento, no hemos encontrado ningún ensayo DCACP en humanos que evalúen los efectos sobre la salud de las AGT en concentraciones dietéticas normales como las presentes en los alimentos ya cocinados.

Las AGT se encuentran concentradas en el germen del trigo, por tanto, es parte constituyente de los productos integrales y que es eliminada en los productos refinados. Está ampliamente demostrado que el consumo de legumbres y cereales integrales, los alimentos que aportan mayor cantidad de lectinas a la dieta, tienen multitud de beneficios para la salud y en la prevención de multitud de patologías. Concretamente, un metaanálisis realizado para verificar si la dieta mediterránea, caracterizada por el consumo de estos alimentos, tiene los efectos positivos en la salud que se ha demostrado en multitud de estudios, confirma que el patrón dietético mediterráneo se asocia fuertemente con reducciones de los marcadores de inflamación y disfunción endotelial (Schwingshackl & Hoffmann, 2014).

Estos hechos, más los escasos estudios encontrados en esta última década sobre la respuesta inmunológica con el consumo de alimentos ricos en AGT, no nos permite analizar la vinculación de las lectinas en la sintomatología de la SGNC, aunque no se debería descartar su posible participación en esta patología.

## 1.6 Tratamiento nutricional

Actualmente el único tratamiento nutricional para las enfermedades relacionadas con la sensibilidad al gluten es la DSG, dieta que se estableció por primera vez en 1953 cuando se observó que un componente del trigo, denominado entonces como “*wheat factor*”, era el mayor desencadenante de la enfermedad celiaca (Dike *et al.*, 1953). Para la SGNC el tratamiento aceptado en estos momentos es también la DSG.

Dada la cantidad de trabajos en los que se considera la posible influencia de los FODMAPS en los síntomas de la SGNC, se ha considerado interesante revisar las bases de la dieta baja en FODMAPS y analizar cómo puede afectar en la remisión de estos. Aunque, los estudios más recientes realizados con ensayos DCACP apuntan a una etiología multifactorial en donde coexiste un efecto funcional producido por los FODMAPs combinado con una reacción inmune producido por los alimentos que contienen gluten y por tanto también ATIs (Dietterich *et al.*, 2018; Leccioli *et al.*, 2017).

Independientemente de la DSG, se han estudiado otros tratamientos tanto nutricionales como farmacológicos, para mejorar los síntomas de la EC que podrían ser estudiadas para la SGNC. La siguiente tabla resume las diferentes vías estudiadas.

**Tabla 10.** Tratamientos nutricionales para la reducción de la toxicidad del gluten.

Estrategia	Objetivo	Mecanismos estudiados	Referencia
Modificación de la dieta	DSG	Eliminación de la dieta del trigo, cebada, centeno y avena o sus variedades híbridas, o alimento que lo contenga	Dike <i>et al.</i> , 1953

**Tabla 9.** Continuación.

Estrategia	Objetivo	Mecanismos estudiados	Referencia
Sustitución/modificación de los cereales con gluten	Reducción de la inmunotoxicidad del gluten	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eliminación del gluten o sustitución del gluten</li> <li>2. Pretratamiento enzimática de la harina de trigo</li> <li>3. Suplementos enzimáticos orales</li> <li>4. Ligantes poliméricos</li> </ol>	Stoven <i>et al.</i> , 2012
Modulación de la permeabilidad intestinal	Restaurar la función de la barrera intestinal, reduciendo la permeabilidad y restableciendo la mucosa intestinal	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reducción de la concentración de la Zonulina</li> <li>2. Ingesta de nutrientes y probióticos con capacidad inmunomodulador</li> </ol>	Andrade <i>et al.</i> , 2015 Leffler <i>et al.</i> , 2015
Modulación de la respuesta inmune	Inducción de la tolerancia inmunológica	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vacunación de tres péptidos: gliadina, secalina y hordeína</li> <li>2. Tratamiento con nematodos gastrointestinales (<i>Necator americanus</i>)</li> <li>3. Inhibición de receptores citoquímicos específicos</li> </ol>	Petersen <i>et al.</i> , 2014 Croese <i>et al.</i> , 2015 Goel <i>et al.</i> , 2017

## 1.6.1 Estrategias para el tratamiento de patologías relacionadas con el gluten

### *1.6.1.1 Modificación de la dieta*

La estrategia menos comprometida para el tratamiento de la SGNC es la DSG, sin embargo, la eliminación completa del gluten es imposible e impracticable y supone numerosas restricciones con implicaciones sociales y económicas. Cuando se habla de una dieta estricta sin gluten se refiere a restringir el consumo de gluten hasta un límite que sea seguro para la mayoría de los afectados. Hay que tener en cuenta que en la industria alimentaria actual el gluten, además de elemento intrínseco de determinados cereales, se añade como aditivo en multitud de productos alimenticios para aprovechar sus características viscoelásticas y de retención de agua.

Un papel a nivel nacional muy importante lo realiza la Federación de Asociaciones de Celiacos de España (FACE), que publica anualmente una lista actualizada de alimentos sin gluten con referencia a la marca y suministrador. Esta lista se elabora a partir de la información que le proporcionan los fabricantes de alimentos y tras un estudio de las normativas vigentes, técnicas de fabricación y componentes de cada producto. En la tabla 11 se detallan alimentos con gluten y aquellos que podrían contener (FACE, 2018).

**Tabla 11.** Alimentos con gluten y alimentos que pueden contener gluten.

Alimentos con gluten	Alimentos que pueden contener gluten
Pan, harinas de trigo, cebada, centeno, avena o triticale	Embutidos
Productos manufacturados en los que en su composición figure cualquiera de las harinas citadas y en cualquiera de sus formas: almidones, almidones modificados, féculas, harinas y proteínas	Productos de charcutería
Bollos, pasteles, tartas y demás de productos de pastelería	Yogures de sabores y con trocitos de fruta
Pastas (fideos, macarrones, tallarines, etc.) y sémola de trigo	Quesos fundidos, en porciones, de sabores
Bebidas malteadas	Patés diversos
Bebidas destiladas o fermentadas a partir de cereales: cerveza, agua de cebada, algunos licores, etc.	Conservas de carne
	Conservas de pescado con distintas salsas
	Caramelos y gominolas
	Sucedáneos de café y otras bebidas de máquina
	Frutos secos fritos y tostados con sal
	Helados
	Sucedáneos de chocolate
	Colorantes alimentarios

Según el Reglamento (CE) núm. 41/2009 de la Comisión, de 20 de enero de 2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, se establece el límite de 20 ppm de contenido en gluten, a este producto se le clasificaría como “sin gluten”, o por debajo de 100 ppm denominado “muy bajo contenido en gluten”.

La poca disponibilidad de alimentos, la dificultad de la identificación del gluten a través de las etiquetas y los altos costes de los alimentos específicos sin gluten en el mercado contribuye a la insatisfacción de las personas sensibles, y a que

la adherencia a largo plazo a una dieta sin gluten esté solo en el 17-45% (Castillo *et al.*, 2015). El tratamiento solamente con una restricción del gluten tiene sus limitaciones de eficacia, por ello nuevas estrategias son interesantes para mejorar no solo la salud sino la calidad de vida que las personas que padecen SGNC y la EC (Stoven *et al.*, 2012).

Por otro lado, la DSG tiene deficiencias nutricionales, diversos estudios indican que hay una disminución de vitaminas y minerales además de un incremento del riesgo de obesidad dado el alto índice glucémico y el alto contenido de grasas saturadas de los alimentos sustitutos del pan y derivados del trigo. Las deficiencias nutricionales más importantes encontradas en personas que mantienen una DGS sea por necesidad como por otros motivos, son los bajos niveles de fibra, folatos, vitamina B12, vitamina D, calcio, hierro, zinc y magnesio (Shepherd y Gibson, 2013; Vici *et al.*, 2016).

### *1.6.1.2 Sustitución, disminución o modificación del gluten*

Dado los problemas de adhesión a una DSG a largo plazo, se han realizado numerosos estudios para disminuir o modificar el gluten consumido mediante diferentes estrategias. El objetivo es eliminar los efectos del gluten, bien por extracción, sustitución, digestión mecánica y química (mediante reacciones enzimáticas) o inactivación (mediante ligantes) tal y como se detalla en la tabla 10. Los trabajos realizados en este campo se pueden enmarcar en cuatro tipos diferentes de mecanismos (Stoven *et al.*, 2012):

1. Sustitución/modificación de los cereales con gluten.
2. Pretratamiento enzimático de la harina de trigo.
3. Suplementos enzimáticos orales.

4. Adición de ligantes poliméricos.

- 1. Sustitución/modificación de los cereales con gluten.** Consiste en utilizar cereales que no contienen gluten. Los cereales más utilizados son el arroz, maíz, trigo sarraceno, sorgo y el teff. El problema del uso de estos cereales en la fabricación de masas es la ausencia de viscoelasticidad, por lo que es necesario siempre añadir algún hidocoloide, emulgente, enzima o proteína, con el inconveniente de que son deficientes en macronutrientes y micronutrientes, como alternativa se incorporan otros ingredientes como aceites omega-3, proteínas específicas, probióticos y prebióticos para mejorar la composición (Molina-Rosell, 2013). Uno de los cereales que cada vez hay más interés es el sorgo, *Sorghum bicolor* L. (grano milo, maíz de Guinea, mijo grande, sorgo blanco). Es un grano consumido desde hace miles de años en África y Asia. Un estudio realizado in vitro con biopsias de pacientes celíacos y posteriormente in vivo, no mostraron ningún problema gastrointestinal ni extraintestinal, ni cambios en los valores serológicos (Ciacci *et al.*, 2007; Aufiero *et al.*, 2018).

También se ha realizado estudios con dos cultivares del *Triticum monococcum* sobre enfermos celíacos. Esta variedad de trigo tiene una toxicidad más baja tras la simulación in vitro de la digestión humana que el trigo común (Mazzarella *et al.*, 2015). Los péptidos del *Triticum monococcum* se degradaron durante el tratamiento gastrointestinal, mientras que gran parte de la gliadina del trigo común sobrevivió a la digestión. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados sobre enfermos celíacos con *Triticum monococcum* han demostrado que no es adecuado estos pacientes según los criterios histológicos y serológicos, aunque fue bien tolerado por la mayoría (5/7), lo que sugiere que no es un cereal seguro

para celíacos, pero que podría ser para la prevención de la EC o para pacientes con SGNC (Zanini *et al.*, 2015).

Otra estrategia es la fertilización e hibridación de diferentes especies de trigo para silenciar determinados genes mediante ARN de interferencia, obteniéndose variedades de trigo con fracciones reducidas de gliadinas que podrían ser aptas para patologías relacionadas con el gluten como la SGNC, aunque no serían aptos para enfermos celíacos. Un grupo de investigación español ha desarrollado una nueva variedad de cereal, llamado Tritordeum, mediante una hibridación de trigo duro y una especie de cebada salvaje de origen chileno (*Hordeum chilense*), se caracteriza por tener un 49% menos de gluten, elevados niveles de luteína, fibra y ácido oleico comparado con el trigo común (Vaquero *et al.*, 2018).

- 2. Pretratamiento enzimático de la harina de trigo.** La fermentación de las masas trigo con lactobacilos y proteasas fúngicas es una de las formas de obtener cereales menos reactivos. Combinaciones específicas de ambos dan lugar a la hidrólisis completa del gluten en la harina de trigo. La masa fermentada de trigo con lactobacilos puede ser mezclada con otras harinas sin gluten para producir un pan con una textura similar a las masas fermentadas normales de trigo. Este pan fermentado no parece que contribuya a incrementar la permeabilidad intestinal de las personas que padecen las EC (Rizzello *et al.*, 2014). Otro método de pretratamiento enzimático usa la transaminación enzimática de la harina de trigo para dejar solamente la fracción de las  $\alpha$ -gliadinas no tóxicas. Esta reacción enzimática se obtiene a través de la incubación de harina de trigo comercial con transglutaminasa microbiana y lisina metil éster (Heredia-Sandobal *et al.*, 2014).



**3. Suplementos enzimáticos orales.** Los residuos del gluten son altamente resistentes a la degradación por las proteasas gástricas y pancreáticas. Un enfoque para disminuir la inmunotoxicidad del gluten es degradarlo en pequeños fragmentos de péptidos no tóxicos antes de que puedan atravesar la mucosa del intestino delgado. Las glutenasas son unas endopeptidasas que de forma natural se encuentran en bacterias, hongos y en humanos, y son capaces de degradar los residuos de prolina, aunque en humanos al expresarse sólo en el citoplasma celular, no son útiles para la degradación de los péptidos del gluten a nivel del tracto gastrointestinal. Se ha identificado, sintetizado y caracterizado diversas enzimas específicas que podrían funcionar en el ambiente gástrico. Estas glutenasas actúan como suplementos enzimáticos que pueden ser usados juntamente con una dieta sin gluten para disminuir los efectos de la exposición accidental con gluten (Bethune y Khosla, 2012; Lähdeaho *et al.*, 2014). Entre ellas, están las enzimas AN-PEP (propil-endopeptidasa derivada del *Aspergillus niger*) que, ingeridas con el pan, se adhieren a los péptidos del gluten, concretamente las gliadinas, procediendo a su digestión mecánica y química en el estómago. Además, la AN-PEP elimina la habilidad del gluten de estimular las células T (Salden *et al.*, 2015). Un trabajo posterior, ensayó la endoproteasa EP-B2, una glutenasa extraída de la cebada, que también se activa bajo condiciones de acidez y es capaz de romper las gluteninas. Se comprobó que una mezcla de la AN-PEP y la EP-B2, eliminaba los efectos del gluten bajo condiciones duodenales y dentro de los 10 minutos de su administración, evitando la reacción del sistema inmunitario y los consiguientes síntomas adversos (Bethune *et al.*, 2012; Siegel *et al.*, 2006). Recientemente se ha realizado un estudio DCACP utilizando un pan que ha sido pretratado con la enzima AN-PEP en dos grupos de adultos, un grupo que se autodiagnostican como sensibles al gluten y que

Llevar una dieta baja en gluten sin prescripción médica, y otro grupo no sensible al gluten, se observó que, aunque la AN-PEP reduce en un 40% el contenido de gluten en el pan tratado, no se observó ninguna mejora y según los autores, esto podría ser debido a que el nivel de gluten no se ha reducido lo suficiente. Otra explicación que proponen es que el gluten no fuese el motor principal de los síntomas en este grupo seleccionado, los FODMAP o los ATIs u otros factores (actualmente desconocidos) podrían ser las principales causas de los síntomas (Rees *et al.*, 2018).

- 4. Ligantes poliméricos.** Los ligantes poliméricos son moléculas de alto peso molecular diseñadas para secuestrar al gluten en el tracto gastrointestinal y por tanto prevenir la degradación, absorción y evitar la reacción inmunológica. La molécula Poly(HEMA-co-ss) es un ligante polimérico que es efectivo al unirse con la  $\alpha$ -gliadina al pH tanto del estómago como del duodeno (Liang *et al.*, 2010; Pinier *et al.*, 2010).

### 1.6.1.3 Modulación de la permeabilidad intestinal

Otra de las estrategias que está en estudio es la modulación de la permeabilidad intestinal. El objetivo principal de esta estrategia es reducir el paso de los antígenos al lumen intestinal (Ver tabla 10).

- 1. La zonulina** es el único modulador de las uniones estrechas entre las células de la pared del tracto digestivo descrito hasta el momento, y que interviene en el proceso del paso de las macromoléculas a través de la pared intestinal y, por lo tanto, en el balance de la tolerancia o la posible respuesta inmune (Fasano, 2011). Los niveles de esta proteína aumentan con la ingesta de gliadinas del gluten en el intestino de pacientes con EC, en individuos con SGNC, como en

pacientes no celíacos, aunque en el caso de la EC está marcadamente sobreexpresada (Hollon *et al.*, 2015). La empresa ALBA Therapeutics ha desarrollado un antagonista de los receptores de la zonulina, AT-1001 (Larazotide acetate), y en febrero de 2014 terminó con éxito los ensayos clínicos de fase II (Leffler *et al.*, 2015). Este fármaco ingerido oralmente evitaría el pasaje de residuos de la gliadina y la respuesta inmunológica de las células T. También se ha ensayado en animales con SII con resultados positivos, por lo que se estima que igualmente sería efectivo para tratar la SGNC.

2. Otra manera de modular la barrera intestinal es mediante la suplementación de **nutrientes y probióticos con capacidad inmunomoduladora**, estos pueden ayudar a regular las respuestas inmunológicas e inflamatorias y restablecer la barrera intestinal. Inmunomoduladores como aminoácidos (glutamina, arginina, triptófano y citrulina), ácidos grasos (cadena corta, omega-3 y ácido linoleico conjugado) y probióticos (*Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y *Lactobacillus*) son posibles compuestos que en la actualidad han sido estudiados por su efecto regulador de la permeabilidad intestinal (Andrade *et al.*, 2015). Los probióticos puede ser una terapia complementaria para la SGNC. Se ha demostrado los efectos antiinflamatorios de la *Bifidobacterium infantis* en enfermos con EC. La presencia de cepas de *Bifidobacterias* durante la digestión intestinal produce secuencias diferentes y menos tóxicas de la gliadina modificando la respuesta inflamatoria e inhibiendo el aumento de la permeabilidad epitelial en el intestino (Laparra y Sanz, 2015). Se han realizado dos ensayos clínicos de una bacteria perteneciente al género de *Bifidobacterium longum*, primero con adultos y después con niños celíacos, observándose cambios en la composición de la flora intestinal y la reducción de la respuesta inflamatoria de forma significativa respecto al grupo que recibió placebo (Olivares *et al.*, 2014). Concretamente con

esta cepa, la empresa valenciana Biópolis SL juntamente con Central Lechera Asturiana desarrollaron un producto lácteo; PROCELIAC, pensado y diseñado para enfermos celíacos, que igualmente podría ser interesante para enfermos con SGNC, que pretende paliar la inflamación intestinal y restablecer la microbiota intestinal (Ramón, 2013).

### *1.6.1.4 Modulación de la respuesta inmune al gluten*

Por último, otro de los tratamientos estudiados es la introducción de la tolerancia al gluten mediante la vacunación, como se detalla en la tabla 10, estrategia ampliamente utilizada en enfermedades alérgicas en la que el paciente se vacuna con dosis cada vez mayores de un alérgeno con el objetivo de inducir tolerancia inmunológica. La vacuna Nexvax 2, combinación de tres péptidos (gliadina, hordeína y secalina), desarrollada por la empresa ImmusanT, ya se encuentra en estos momentos en el inicio de la fase II. Los ensayos clínicos previos presentan unos resultados positivos para aquellas personas con intolerancia al gluten con el haplotipo HLA-DQ2. Después de 3 semanas de vacunación, se ha visto que es segura y bien tolerada por pacientes celíacos que están siguiendo una dieta sin gluten (Goel et al., 2017; Petersen et al., 2014).

### **1.6.2 La dieta baja en FODMAPs**

La popularidad de la dieta baja en FODMAPs para el tratamiento del SII y para otros desordenes funcionales del intestino está en aumento, no solo por el importante trabajo de marketing que hay detrás, con registro de la marca “FODMAP”, con libros que explican la metodología e incluso con la existencia de una

app, sino también por haber sido diseñada con una buena base científica. Un metaanálisis reciente, confirma su efectividad en la resolución de síntomas funcionales del SII, concretamente es efectiva para la disminución de la diarrea y los gases (Marsh *et al.*, 2016).

Según los promotores de esta dieta se necesita un seguimiento estricto por un profesional, su uso prolongado sin su supervisión puede llevar a deficiencias nutricionales (Catassi *et al.*, 2017). Según Gibson y Shepherd (2009) no debería considerarse como un hábito para toda la vida ni es una dieta “sin FODMAPs”, es una dieta “baja en FODMAPs” y no debería mantenerse más de 6–8 semanas. Durante este periodo lo que se debe hacer es sustituir alimentos que contienen FODMAPs por opciones que contienen bajas cantidades o reduciendo las cantidades totales consumidas en cada comida o durante el día (Ver tabla 12). Después de la fase de reducción, se irán introduciendo uno a uno estos alimentos y en cantidades graduales para identificar cuál de ellos es el causante de los síntomas gastrointestinales. El objetivo es incrementar gradualmente los niveles de tolerancia del sujeto además de ampliar el espectro de alimentos que se pueden introducir en la dieta.

**Tabla 12.** Lista de alimentos de alto y bajo contenido en FODMAPs sustitutos (Gibson y Shepherd, 2009).

FODMAP	Grupo de alimentos	Alto contenido en FODMAPs	Bajo contenido en FODMAPs
FRUCTOSA	Vegetales	Espárragos, alcachofas	El resto de los vegetales
	Frutas	Manzanas, peras, sandía, higos, mango, fruta en lata	Naranja, mandarina, kiwi, piña, fresas, frutos del bosque, limón, lima y uvas

**Tabla 11:** Continuación.

<b>FODMAP</b>	<b>Grupo de alimentos</b>	<b>Alto contenido en FODMAPs</b>	<b>Bajo contenido en FODMAPs</b>
<b>FRUCTOSA</b>	Azúcares y edulcorantes	Miel, siropes, fructosa	Azúcar, glucosa
	Bebidas	Fruta concentrada, zumos tropicales, ron	Zumo de naranja, cerveza, vino tinto y blanco, ginebra, whisky y vodka
<b>OLIGOSACÁRIDOS</b>	Vegetales	Ajo, cebolla, puerro, coles de Bruselas, brócoli, remolacha, alcachofas	Zanahoria, cebolla tierna, espinacas, patatas, tomate, lechuga, pepino, berenjena, calabaza, calabacín y nabos
	Legumbres	Lentejas, alubias, garbanzos	Guisantes verdes
	Cereales	Trigo (pan, pasta, cuscús, bollería...), cebada y centeno	Resto de cereales
	Frutas	Sandía, nectarinas y melocotón	Naranja, mandarina, kiwi, piña, fresas, frutas del bosque
	Frutos secos	Pistachos y castañas	Sésamo, cacahuetes, nueces y pipas de girasol
<b>LACTOSA</b>	Lácteos y derivados	Leche de vaca, cabra y oveja	Leche sin lactosa y bebida de soja
		Quesos frescos	Queso curado
		Helados basados en lácteos	Mantequilla
		Natillas y cremas	

Tabla 11: Continuación.

FODMAP	Grupo de alimentos	Alto contenido en FODMAPs	Bajo contenido en FODMAPs
POLIOLES	Vegetales	Setas, guisantes y coliflor	Zanahoria, cebolla tierna, espinacas, patatas, tomate, lechuga, pepino, berenjena, calabaza, calabacín y nabos
	Frutas	Manzanas, peras, nectarinas, ciruelas, sandía, albaricoques, aguacate, cerezas	Naranja, mandarina, kiwi, piña, fresas, frutos del bosque, limón, lima y uvas
	Azúcares y edulcorantes	eritritol, sorbitol, lactitol, xilitol, manitol y maltitol	Azúcar y glucosa

La cuestión más controvertida sobre esta dieta es que los beneficios fisiológicos atribuibles a los FODMAPS se estarían perdiendo con su reducción (Catassi *et al.*, 2017; Molina-Infante *et al.*, 2016). Los FODMAPs incrementan el volumen de las heces, mejoran la absorción del calcio, modulan la función inmunitaria y reducen los niveles de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. El mayor problema es la drástica reducción de determinados FODMAPs como los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS) que estimulan selectivamente el crecimiento de grupos de bacterias beneficiosas para el intestino como las *Bifidobacterias* con efectos prebióticos. Un estudio demostró que una dieta baja en FODMAP reduce significativamente, después de 4 semanas, las *Bifidobacterias* del lumen intestinal y sugiere el uso de un pre o probiótico si se mantiene a largo plazo (Halmos *et al.* 2015; Marsh *et al.*, 2015).

Además, el criterio de inclusión de un alimento en la lista de FODMAPs no está totalmente definido, esta lista está constantemente actualizándose y es bastante relativa. El contenido de FODMAP en los alimentos depende de la variedad, el clima, las estaciones, las marcas, la madurez de los alimentos y los métodos de cocción, y además muchos alimentos aún no han sido analizados para determinar su contenido, la mayor información existente es sobre alimentos habituales en la dieta australiana (Muir *et al.*, 2009). Por tanto, no se pueden elaborar directrices universales con precisión y cada país debería realizar sus propios análisis de los alimentos para determinar el contenido de FODMAPs (Marsh *et al.*, 2015).



# Objetivos





## 2. Objetivos

---

El objetivo principal de esta tesis doctoral es analizar el papel que juegan los inhibidores de las amilasas y las tripsinas (ATIs) en la iniciación de los síntomas característicos de las personas que padecen Sensibilidad al Gluten No Celiaca (SGNC) en base a los conocimientos actuales y conocer las técnicas analíticas para su determinación en matrices alimentarias.

Para alcanzar el objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos que se llevarán a cabo mediante revisión bibliográfica:

- Estudiar el papel de los ATIs en la iniciación de la inmunidad innata característica de la SGNC.
- Analizar la bioactividad de los ATIs y la actividad proinflamatoria en los alimentos que los contienen en función del tipo de procesado, así como investigar si existen diferencias significativas entre cereales.
- Valorar los factores que puedan predisponer a un individuo a tener una mayor sensibilidad con el consumo de alimentos que contienen ATIs.
- Investigar las técnicas analíticas utilizadas para evaluar el contenido en ATIs en cereales y derivados.



# Resultados





## 3. Resultados

---

### 3.1 Sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC): manejo nutricional de la enfermedad





**Nutr. Clin. Diet. Hosp. 2017; 37: 179-190**

**Sensibilidad al gluten no-celiaca (SGNC): manejo nutricional de la  
enfermedad**

**Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): Nutritional management of the  
disease**

Yolanda Reig-Otero, Jordi Mañes, Lara Manyes\*.

Laboratorio de Seguridad alimentaria y Toxicología. Universitat de València.

\*Correspondencia:

email: lara.manyes@uv.es



## **Resumen**

La sensibilidad al gluten no celiaca es un trastorno relevante del que no existen en la actualidad suficientes estudios científicos ni biomarcadores específicos para identificar claramente esta patología de forma separada de otros trastornos gastrointestinales. El diagnóstico tardío de este trastorno conduce al paciente a una serie de desórdenes, no necesariamente del ámbito intestinal, que pueden desembocar en una enfermedad crónica, autoinmune, inflamatoria o neoplásica. Los síntomas del trastorno no suelen ser reportados de forma inmediata a los profesionales de la salud, dado que muchos de los pacientes afectados no los consideran de relevancia dentro de su patología de base, igualmente, no los relacionan con una posible sensibilidad al gluten, o creen que estos problemas son derivados de la edad o de otras situaciones (malas digestiones, comidas copiosas, efectos adversos a la medicación). Por otro lado, los análisis realizados a los pacientes que presentan estos síntomas para descartar una posible celiaquía o una intolerancia alimentaria suelen dar negativos, descartando de entrada que el gluten esté implicado en estos trastornos. Esto hace que sea una enfermedad que puede afectar de forma sutil al organismo, y que podría conllevar complicaciones más graves.

**Palabras clave:** Sin gluten, celiaquía, hipersensibilidad al trigo, gliadina, terapia nutricional

**Abstract**

*The Non-Celiac Gluten Sensibility is a relevant disorder that there are not enough scientific studies and specific biomarkers to identify strictly this pathology separately from others gastrointestinal disorders. The later diagnosis could lead to a number of pathologies, not necessarily in the intestinal area, which can lead to a chronic, autoimmune, inflammatory or neoplastic disease. The symptoms are not usually reported immediately to healthcare professionals, given that many of the affected patients do not consider relevant in its base pathology, likewise not relate to a possible sensitivity to gluten, or they believe that these problems are derived from age or other situations (indigestion, heavy meals, medication side effects). Furthermore, tests performed to patients with these symptoms to rule out celiac disease or food intolerance, often are negative discarding that gluten is involved in these disorders. This makes it a disease that is affecting slowly patient's health that could lead to more serious complications.*

**Key words:** *Gluten-Free; Celiac Disease; Wheat Hypersensitivity, Gliadin; Nutrition Therapy*

## **Abreviaturas**

EC: Enfermedad Celiaca

AG: Alergia al gluten

SGNC: Sensibilidad al gluten no celiaca

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

DSG: Dieta sin gluten

FODMAPs: Hidratos de carbono de cadena corta, oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables.

TLR2: Receptor tipo Toll-2. Glicoproteína transmembrana que forman parte del sistema inmunitario innato.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

PCR: Proteína C reactiva que aumenta sus niveles en los procesos de inflamación

CLDN-4: Claudina. Proteína reguladora de la permeabilidad intestinal.

TEER: Resistencia eléctrica transepitelial.

SII: Intestino Irritable

EL: Enteritis Linfocitaria

ATIs: Inhibidores de la amilasa y tripsina

AN-PEP: Propil-endopeptidasa derivada del *Aspergillus Níger*

## **Introducción**

Desde hace 10.000 años el trigo forma parte de la dieta occidental como alimento base, y durante este tiempo se ido seleccionando de forma espontánea y gracias a la industria alimentaria, variantes de trigo más resistentes a las plagas y a las condiciones climáticas, además de más productivas y con unas mejores características para su manipulación en la producción de masas panarias (1). El consumo del trigo se ha incrementado progresivamente en los últimos cien años. Su producción mundial en 2015 ha alcanzado los 734.5 millones de toneladas frente a las 560 millones de toneladas del 2003 (2). La viscoelasticidad de estas masas ha sido la característica clave que ha dado una ventaja al trigo sobre otros cereales. Esta propiedad la confiere el gluten. Es por ello que la industria ha utilizado el gluten no solo en la fabricación de masas, sino como aditivo en multitud de alimentos. Este hecho podría haber favorecido considerablemente la sobreexposición de la población con el gluten, de tal manera que se podría correlacionar con el crecimiento de la prevalencia de la sensibilidad a los alimentos con gluten, aunque no hay ningún estudio que confirme esta afirmación (3).

Las dos enfermedades mejor conocidas que están relacionadas con la exposición al gluten son celiaquía o enfermedad celiaca (EC) y la alergia al gluten (AG). En ambas, la reacción al gluten está mediada por la activación de las células T en la mucosa gastrointestinal. La EC es una reacción autoinmune donde la predisposición genética juega un rol importante y está fuertemente asociada con antígenos leucocitarios de histocompatibilidad (HLA) de clase II conocidos como HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Por otro lado la AG es una reacción alérgica adversa a las proteínas del trigo, los anticuerpos IgE juegan un rol central en su patogénesis. Ambas mejoran con la eliminación del gluten, pero no todos los trastornos

relacionados con el gluten se pueden englobar en estas dos grandes patologías (4).

Hay una tendencia cada vez más extendida en la población de eliminar el gluten de la dieta sustentado por personas, que reportando síntomas intestinales (diarrea o estreñimiento, dolor abdominal, meteorismo, sensación de plenitud postprandial, etc.), y extraintestinales (dolor de cabeza, fatiga, depresión, dolores musculares, dermatitis, anemia, etc.), sin un diagnóstico evidente de padecer la enfermedad celiaca EC o alergia al gluten AG, han notado una notable mejora con su eliminación, volviendo estos a reaparecer con la inclusión del gluten en la dieta. Este trastorno fue originalmente descrito en 1980 (5) y redescubierto estos últimos años. Su prevalencia está lejos de ser definida, los pocos datos disponibles no se pueden considerar robustos variando de un 0,6% (6) hasta el 10% (7). Recientemente se ha clasificado por la comunidad científica dentro de los desórdenes relacionados con el gluten denominándose como Sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) definiéndose de forma tan general como aquellos casos de reacción al gluten en donde se ha descartado tanto los mecanismos gastrointestinales autoinmunes como los alérgicos (diagnóstico por exclusión) (4).

Así como la EC está claramente definida que su principal mecanismo patogénico está relacionado con la disminución de la función de la barrera epitelial o aumento de la permeabilidad, la patogénesis de la SGNC está todavía sin definir claramente. Existen estudios en donde la relacionan con reducción de la permeabilidad o incremento de la función barrera epitelial (8), si bien otros estudios no lo confirman (9).

De lo que sí hay consenso científico es que en la actualidad no existen biomarcadores claros para diagnosticar la SGNC, el único diagnóstico posible es a partir de la exclusión una vez se obtienen resultados negativos en las pruebas para

la diagnosis de la EC y la AG principalmente. Ante la falta de estos biomarcadores y la necesidad de estandarizar un procedimiento para su diagnóstico, en octubre de 2014, la *3rd Internacional Expert Meeting in Gluten Related Disorders*, alcanzó un consenso de cómo se ha de confirmar un diagnóstico de SGNC. Se definió un protocolo consistente en dos etapas, la primera en la que realiza un seguimiento al paciente con una DSG y la segunda, consistente en medición del efecto de la reintroducción del gluten (10). La falta de un criterio estricto para su diagnóstico, ha puesto en evidencia un solapamiento en la identificación del Síndrome del Intestino Irritable (SII) y la SGNC (11, 12, 13). Los pacientes que sufren estos síntomas es un grupo heterogéneo dado el gran espectro de síntomas que reportan; de hecho, estos síntomas desaparecen, incluso algunos de tipo neurológico, cuando se elimina el gluten de la dieta. Aunque tal aproximación diagnóstica carece de especificidad y está sujeto al riesgo del efecto placebo. Tampoco hay estudios suficientes como para validar si esta condición mantenida en el tiempo puede ser el germen de otras enfermedades (14, 15, 16).

La mayoría de estudios se han centrado en el gluten como responsable de estos síntomas, aunque también se ha relacionado con otras proteínas del trigo como los inhibidores de las amilasas y las tripsinas (ATIs). También se cuestiona si estos síntomas pudiesen estar relacionados con carbohidratos fermentables de cadena corta o FODMAPs, carbohidratos que, debido a su pequeño tamaño molecular y su rápida fermentación, pueden causar distensión del lumen intestinal (17, 18).

Es evidente el interés que genera la SGNC en la actualidad, no solo desde el punto de vista clínico al intentar encontrar biomarcadores que la puedan identificar precozmente, establecer cuáles son los mecanismos inmunológicos que



están detrás de ella y cuáles son las consecuencias a largo plazo, sino también desde el punto de vista dietético y nutricional ya que, aunque se ha demostrado que la eliminación del gluten en la dieta es eficaz, se desconoce el papel que juegan las proteínas del gluten, los carbohidratos de cadena corta u otros constituyentes del trigo. Hay un espacio importante para la investigación nutricional relacionada con esta enfermedad diferente a la eliminación del gluten de la dieta, por ejemplo, el estudio de probióticos específicos que modifiquen la respuesta de la microbiota al gluten, la validación de tratamientos que mejoren la respuesta inmune, hidrólisis del gluten, etc.

### **Objetivos**

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar los estudios más recientes centrados en este trastorno y poner a disposición los distintos enfoques nutricionales que se están desarrollando en la actualidad. Los objetivos específicos son identificar y establecer un contexto que enmarque la sensibilidad al gluten no celiaca, analizar diversas causas barajadas sobre la etiología de la sensibilidad al gluten no celiaca e identificar posibles estrategias que favorezcan el funcionamiento normal, el restablecimiento de la homeostasis intestinal y de la integridad de la mucosa epitelial, como estrategia complementaria a la eliminación del gluten en la dieta. En la figura 1 se hace un esquema del alcance de esta revisión.

### **Métodos**

Se ha realizado una revisión de la literatura científica internacional publicada sobre la SGNC consultando varias bases de datos de revistas científicas indexadas como Medline, Scielo, Science Direct y Scopus incluyendo estudios clínicos, estudios de caso, revisiones y actas de conferencias. Los términos iniciales

de búsqueda fueron: "non celiac gluten sensitivity" OR NCGS OR "non celiac wheat sensitivity" OR "wheat sensitivity". Se realizó sobre todos los años para finalmente seleccionar los trabajos publicados desde el año 2000 siendo el resultado de la consulta 190 artículos, de ellos 176 dentro del periodo 2010-2016. También se incluyeron fuera de este periodo varios artículos relevantes que aportaron información base para el análisis de los antecedentes. Para terminar se realizó una segunda búsqueda en las mismas bases de datos incluyendo inicialmente los términos de "Celiac Disease" AND ("treatment" OR "therapies" OR "therapeutic strategies") AND "gluten" durante el mismo periodo de tiempo, resultando 957 artículos (548 últimos 5 años), de ellos sólo se seleccionaron aquellos que aportaban información sobre terapias que no eliminan el gluten totalmente de la dieta.

## **Resultados y discusión**

### *1. Enfoque clínico*

La primera vez que la sensibilidad al gluten se describió fue en 1980 (5). Ocho pacientes, de los que no había ninguna evidencia de EC y con biopsias normales, dolores abdominales y diarrea crónica, mejoraban de forma radical con una dieta sin gluten, reapareciendo estos síntomas cuando el gluten volvía a ser introducido. Hasta el año 2010 (19), no se describió las características clínicas y diagnósticas de este trastorno y fue a partir de entonces cuando un número creciente de trabajos han confirmado la existencia de este trastorno, reconociéndose en la comunidad científica dentro del espectro de los desórdenes relacionados con el gluten. En el 2012 se llega a un consenso en su nomenclatura como "Sensibilidad al gluten no celiaca - SGNC" dejando reflejado en el mismo término el desconocimiento que aún existe de esta condición (4).

### *1.1 Patogénesis*

Los datos que existen actualmente sobre su patogénesis, la mayor parte derivados de un estudio de Sapone et al. (20), sugieren que los mecanismos que están involucrados son diferentes a la de la enfermedad celiaca, aunque hay procesos comunes a ambas. (Figura 2).

Hay dos aspectos que han sido hasta ahora analizados por los investigadores: el posible rol del sistema inmunitario adaptativo frente al innato y la función barrera epitelial de la mucosa intestinal.

En relación con la mucosa intestinal, en la EC está claramente establecido que hay una pérdida de la función barrera y que esta, representa un mecanismo clave para el desarrollo de la autoinmunidad por el continuo paso de antígenos a través del epitelio intestinal. En el estudio de Sapone et al. (20) se analizó esta permeabilidad utilizando el test de la lactulosa/manitol y el análisis de la expresión de proteínas reguladoras de la permeabilidad intestinal. Sujetos con SGNC no presentan cambios en la permeabilidad, aunque en los pacientes con EC sí que se detectó un incremento. Estos resultados se repiten en otro mejor diseñado, realizado en 2011 por Biesikierski et al., doble ciego aleatorio y con placebo, en personas que reportan síntomas de SGNC y no presentan la EC (21). No se observan cambios significativos en la permeabilidad intestinal, ni ningún indicador anormal relacionados con la EC. Sapone et al. realizó además un análisis PCR de las proteínas de transmembrana. Se observó un incremento de la expresión de la proteína CLDN-4 en muestras de biopsias duodenales de pacientes con SGNC frente a los pacientes con EC. Esto podría ser indicativo de que estos sujetos tienen una mucosa menos permeable que aquellos con EC (20), resultado que no confirma la investigación de Biesikierski et al. Por otro lado, un estudio (22) de

2015, en el que utiliza la técnica de ensayo celular TEER, se analiza los cambios de permeabilidad del intestino de biopsias intestinales de varios grupos de sujetos (EC, SGNC, EC en remisión y grupo de control). Todos los grupos presentan una permeabilidad intestinal incrementada después de la exposición a la gliadina del gluten. Tanto los pacientes con SGNC y los EC activa muestran un mayor incremento en la permeabilidad intestinal que el grupo de EC en remisión. Según los resultados de un estudio publicado en 2016 ambos factores se presentan en los pacientes con SGNC, se han encontrado marcadores de activación del sistema inmune en conjunción con marcadores que se relacionan con una integridad comprometida del epitelio intestinal y una traslocación bacteriana incrementada (23).

En relación a la posible participación de factores genéticos, todos los estudios realizados hasta el momento indican que la SGNC no está relacionada con un perfil genético cómo la mayoría de los pacientes de EC. La EC está caracterizada por una fuerte asociación con genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El 95% de los pacientes tienen un haplotipo HLA-DQ2 y el resto 5% tienen el HLA-DQ8, mientras que solo aproximadamente el 40% de los pacientes con SGNC tienen el HLA-DQ2 y/o el HLA-DQ8, un porcentaje un poco superior a la población en general (38%) (20, 24).

Aunque tanto la inmunidad innata como adaptativa tienen un rol fundamental en el desarrollo de la EC, parece que la SGNC está relacionada sólo con la activación de la respuesta innata. El marcador TLR2, tiene un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria innata y está considerablemente incrementado en la SGNC frente a la enfermedad celiaca. Sin embargo un estudio abre la posibilidad de que haya un pequeño

componente adaptativo en la patogénesis de la SGNC (25), ya que un número de pacientes mostraron un incremento de las células T CD3+ intraepiteliales comparado con los controles después de la ingesta de gluten, aunque en número muy inferior al de aquellos con enfermedad celiaca. Esto explica por qué la SGNC no esté acompañada con un fenómeno significativo autoinmune.

Recientemente diversos estudios sugieren la posibilidad de que la SGNC implique la activación de la respuesta innata a la gliadina pero con fallo en la respuesta adaptativa posterior (7, 22, 26). La tabla 1 relaciona las diferencias encontradas entre los marcadores para la diagnosis de la EC y los resultados obtenidos con pacientes con SGNC. El único marcador serológico utilizado para la identificación de la EC que da positivo en sujetos con síntomas de la SGNC, son los anticuerpos Antigliadina (AAG-IgG), pero sólo en el 50% de los casos analizados. El resto de marcadores son negativos y la respuesta inmunológica a la gliadina no se correlaciona con posibles marcadores genéticos de la enfermedad celíaca, como HLA-DQ2/HLA-DQ8, ni existe un aumento del número elevado de linfocitos intraepiteliales (24).

A fecha de redacción de este artículo se han encontrado 31 estudios clínicos, relacionados con la SGNC (27), de los cuales 16 están en activo y en fase de reclutamiento y 15 ya se han completado. Entre todos ellos, se han identificado 12 con el objetivo de encontrar biomarcadores que puedan identificar mejor esta patología.

### *1.2 Epidemiología*

En la actualidad la epidemiología de la SGNC está lejos de establecerse debido a que los estudios realizados hasta el momento presentan fallos metodológicos. Las muestras no son homogéneas, hay estudios basados en la

tolerancia al gluten percibida por el paciente sin validación clínica con el riesgo que los resultados estén solapados con otros desórdenes intestinales, como el Síndrome del Intestino Irritable (SII), la Enteritis Linfocitaria (EL) o fases iniciales de la EC. Aun así, se presupone que la prevalencia es más elevada que la enfermedad celiaca (en torno al 1%) situándose en un rango del 0,55% y del 6% según los estudios más relevantes.

Puede presentarse a cualquier edad aunque parece ser que es más frecuente en adultos que en niños (media de edad de 40 años), y como en otros desórdenes intestinales, la SGNC es más prevalente en mujeres que en hombres. Muchos de los casos son diagnosticados en la vejez o cuando, al cabo de los meses o años de un seguimiento clínico, se han descartado otros trastornos sin que desaparecieran los síntomas propios de la SGNC (28, 29). En la tabla 2 se presentan los principales estudios realizados de la prevalencia de la SGNC.

### *1.3 Manifestaciones clínicas*

La SGNC presenta síntomas intestinales (96% pacientes) y extraintestinales (97%). Los principales síntomas intestinales son dolor abdominal y gases, seguido por la diarrea y el estreñimiento. En cuanto a los síntomas extraintestinales, el más común es la “mente nublada”, descrita como una sensación de letargo y vista borrosa que ocurre después de consumir comidas que contienen gluten, seguido por fatiga, dolor de cabeza, dolor de piernas y brazos, depresión y ansiedad y anemia (4, 24).

Los síntomas intestinales de la SGNC se identifican con síntomas del SII, a los que se añaden las manifestaciones sistémicas o extraintestinales (21) (Tabla 3).

En aproximadamente el 47% de los pacientes con SGNC coexiste con el

SII, y sobre el 35% han tenido un diagnóstico previo de intolerancias alimentarias como la fructosa y la lactosa, más del 20% a metales, otros alimentos o alérgenos (ácaros, polen, pelo de gato/perro, gramíneas). Otro aspecto relevante es que la SGNC es frecuente en familiares de primer o segundo grado afectados por EC.

Otro aspecto importante en la SGNC es el riesgo de complicaciones del tipo neurológico (esquizofrenia, autismo, cambios de humor) (16, 30), reumáticas (fibromialgia, espondiloartropatías y enfermedades autoinmunes sistémicas) (15), intestinales (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa) (16), incluso linfomas y otras neoplasias gastrointestinales (14). La falta de marcadores biológicos claros para la identificación de esta enfermedad y su superposición con otros síntomas gastrointestinales y alergias, hace que no se diagnostique en un primer estadio la enfermedad, por lo que los tratamientos que se recomiendan no logran eliminar los síntomas sino que incrementan las posibles complicaciones (28, 29).

## *2. Enfoque nutricional*

La rápida mejora de los pacientes con SGNC a la eliminación del gluten de la dieta, sugiere a priori que el principal factor alimentario causante de este trastorno es el gluten, aunque no se puede descartar otros componentes de la alimentación actual puedan estar contribuyendo a los síntomas de la SGNC.

El aumento del consumo de un gran espectro de alimentos que contienen trigo y por tanto gluten como fracción mayoritaria de sus proteínas, podrían haber contribuido a un incremento alarmante de la incidencia de los desórdenes relacionados con el gluten en los países industrializados. En un estudio realizado por Catassi et al (31), se observó que durante los últimos 30 años, la prevalencia de enfermedades de la EC entre los adultos en los EE.UU aumentó 5 veces, duplicándose aproximadamente cada 15 años. Factores que podrían

participar en este aumento podrían estar relacionados con la cantidad y la calidad de gluten ingerido, el tipo y duración de la fermentación de masa de trigo, el excesivo refinado del trigo (32), además de otras como el estado de la microbiota intestinal y sus cambios en el tiempo, infecciones entéricas, así como el estrés.

### *2.1 El gluten*

El gluten representa el 80% del total de proteína del grano del trigo, formado por gliadinas y gluteninas (1). El gluten está presente en otros cereales como el centeno (*Secale cereale*), cebada (*Hordeum vulgare*), espelta (*Triticum spelta*), kalmut (*Triticum turgidum*), triticale (*Triticum spp x Secale cereale*) y algunas variedades de avena (*Avena sativa*).

Según la CE se entiende por gluten la fracción proteínica del trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas y derivados de los mismos, que algunas personas no toleran y que es insoluble en agua así como en una solución de cloruro sódico de 0.5 M. Desde el punto de vista de su uso alimentario, el gluten también puede ser definido como la masa gomosa que se obtiene cuando se lavan las masas de trigo para eliminar los gránulos de almidón y los componentes solubles. Dependiendo de la meticulosidad del lavado, el contenido en proteínas es del 75-85% y de lípidos del 5-10% en seco.

La fracción de gliadinas del gluten es mayoritariamente responsable de los efectos de la EC, especialmente la  $\alpha$ -gliadina y la  $\gamma$ -gliadina ya que la mayoría de las células T específicas de la HLA-DQ2 o HLA-DQ8 derivadas de las biopsias de intestino delgado de los pacientes celíacos, parecen reconocer esta fracción. También se ha observado que pacientes con SGNC presentan una permeabilidad intestinal, aunque mucho más reducida que en la EC, después de la exposición a las gliadinas del gluten (22). Esta fracción podría ser considerada como uno de los



promotores de la sintomatología de la SGNC dado estudios randomizados doble-ciego con placebo que se han realizado hasta el momento parecen que indiquen que las proteínas del gluten son las que tienen el rol más importante en esta patología (33, 34, 35).

### *2.2 Inhibidores de la amilasa y tripsina*

Trabajos recientes confirman que no solo las proteínas del gluten pueden ser el desencadenante de la SGNC, otras proteínas del trigo podrían estar involucradas en este síndrome. En particular, los inhibidores de la amilasa y la tripsina (ATIs) son unos fuertes activadores de la respuesta del sistema inmune innato (36). Un estudio publicado en 2012 (37), sobre los factores desencadenantes de la activación inmune innata en cereales, describe el papel de las ATIs del trigo. Según los investigadores son un potente estimulador de los TLR4 en el intestino y no sólo es relevante para la EC (38, 39), sino que es probable que tenga consecuencias para los pacientes con la SGNC y, posiblemente, para los pacientes con síndrome de intestino irritable.

Los ATIs representan aproximadamente el 4% del total de la proteína del trigo y son altamente resistentes a las proteasas del intestino. Son una de las principales proteínas de defensa, participando en la resistencia de los cereales a las plagas y parásitos inhibiendo sus enzimas digestivas. El cultivo de trigo de alto rendimiento y altamente resistente a las plagas conduce a la selección automática de variedades con un alto contenido en ATIs. No solo la selección ha potenciado el aumento de los ATIs, estas están consideradas como un gen útil en la lucha contra los insectos, diversos grupos de investigación han desarrollado plantas de trigo transgénicas con sobreexpresión de los inhibidores de la amilasa tripsina (40).

### *2.3 Hidratos de carbono de cadena corta fermentables (FODMAPs)*

Los FODMAPs son hidratos de carbono de cadena corta, oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos fermentables y polioles como los fructanos, la fructosa, lactosa y galacto-oligosacáridos. Pueden causar distensión del lumen intestinal con aumento de líquido y gas dado su pequeño tamaño molecular y su rápida fermentabilidad, conduciendo a síntomas gastrointestinales. Los alimentos que contienen FODMAPs son granos y cereales, concretamente el trigo, centeno y cebada, la leche, legumbres, miel, frutas (sandía, cerezas, mango y pera) y vegetales (achicoria, hinojo, remolacha y puerro). Tienen tres características en común, su baja absorción en el intestino, son rápidamente fermentados por las bacterias colónicas, lo que favorece la producción de hidrógenos, dióxido de carbono y gases metano, e incrementan el paso deliberado de agua dentro del intestino debido a su alta actividad osmótica, aumentando el agua intestinal. Se ha demostrado que una dieta baja en FODMAPs mejora considerablemente los síntomas de pacientes con SII (17, 18).

### *3. Estrategias para el tratamiento de la sensibilidad al gluten*

Actualmente el único tratamiento aceptado para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la sensibilidad al gluten es la dieta sin gluten (DSG) establecido en 1940 en el momento que se observó que el gluten era el mayor desencadenante de la enfermedad celiaca. Para la SGNC, en estos momentos la DSG es la única terapia aceptada.

Independientemente de la DSG, se han estudiado otros tratamientos tanto nutricionales como farmacológicos, para mejorar los síntomas de la EC que podrían ser trasladables a la SGNC. La tabla 4 resume las diferentes vías estudiadas.

La estrategia menos comprometida es la dieta sin gluten pero su eliminación completa es imposible e impracticable y supone numerosas

restricciones debido a sus implicaciones sociales y económicas. Cuando se habla de una dieta estricta sin gluten se refiere a restringir el consumo de gluten hasta un límite que sea seguro para la mayoría de los afectados. Hay que tener en cuenta que en la industria alimentaria actual el gluten, además de elemento intrínseco de determinados cereales, se añade como aditivo en multitud de productos alimenticios aprovechándose de sus características viscoelásticas y de retención de agua.

En la tabla 5 se detallan alimentos con gluten y aquellos que podrían contener. Un papel a nivel nacional muy importante lo realiza la Federación de Asociaciones de Celiacos de España (FACE - <http://www.celiacos.org/>), que publica anualmente una lista actualizada de alimentos sin gluten con referencia a la marca y suministrador. Esta se elabora a partir de la información que le proporcionan los fabricantes de alimentos y tras un estudio de las normativas vigentes, técnicas de fabricación y componentes de cada producto.

Según el Reglamento (CE) núm. 41/2009 (41), se establece el límite de 20 ppm de contenido en gluten, a este producto se le clasificaría como “sin gluten”, o por debajo de 100 ppm denominado “muy bajo contenido en gluten”.

La avena, incluida entre los cereales que contienen gluten, está en entredicho. Se ha demostrado que además de la sensibilidad individual de cada paciente, la inmunotoxicidad de la misma varía en función de la variedad de la avena cultivada, encontrándose variedades inocuas para los pacientes con la EC.

La poca disponibilidad de alimentos, la dificultad de la identificación del gluten a través de las etiquetas y los altos costes de los alimentos específicos sin gluten en el mercado contribuye a la insatisfacción de los pacientes y a que la adherencia a largo plazo a una dieta sin gluten esté solo en el 17-45% (42). El

tratamiento solamente con una restricción del gluten tiene sus limitaciones de eficacia, por ello nuevas estrategias son interesantes para mejorar no solo la salud sino la calidad de vida que los pacientes de la SGNC y la EC.

La modificación del trigo es una de las estrategias que podrían ser utilizadas en el tratamiento de SGNC. El objetivo es eliminar los efectos tóxicos del gluten, bien por extracción, sustitución, digestión mecánica y química (mediante reacciones enzimáticas) o inactivación (mediante ligantes). Los estudios realizados en este campo se pueden enmarcar en cuatro tipos diferentes de mecanismos utilizados (43).

1. Disminución del gluten. Consiste en utilizar cereales que no contienen gluten. Los cereales más utilizados son el arroz, maíz, trigo sarraceno, sorgo y el teff. El problema del uso de estos cereales en la fabricación de masas es la ausencia de viscoelasticidad, por lo que es necesario siempre añadir algún hidrocoloide, emulgente, enzima o proteína, con el inconveniente de que son deficientes en macronutrientes y micronutrientes. Como alternativa se incorporan otros ingredientes como aceites omega-3, proteínas específicas, probióticos y prebióticos para mejorar la composición (30). Uno de los cereales que cada vez hay más interés es el sorgo, *Sorghum bicolor L.* (grano milo, maíz de Guinea, mijo grande, sorgo blanco). Es un grano consumido desde hace miles de años en África y Asia. Estudios realizados in vivo a pacientes con EC no han mostrado ningún problema gastrointestinal ni cambios en los valores serológicos. Otra estrategia es la fertilización e hibridación de diferentes especies de trigo para silenciar determinados genes mediante ARN de interferencia, obteniéndose variedades de trigo con fracciones reducidas de gliadinas que podrían ser aptas para patologías

relacionadas con el gluten como la SGNC, aunque no serían aptos para enfermos celíacos.

2. Pretratamiento enzimática de la harina de trigo. La fermentación de las masas trigo con lactobacilos y proteasas fúngicas es una de las formas de obtener trigo menos tóxico. Combinaciones específicas de estos dos elementos dan lugar a la hidrólisis completa del gluten en la harina de trigo. La masa fermentada de trigo con lactobacilos puede ser mezclada con otras harinas sin gluten para producir un pan con una textura similar a las masas fermentadas normales de trigo. Este pan fermentado no parece que contribuya a incrementar la permeabilidad intestinal de los pacientes con EC (31). Otro método de pretratamiento enzimático usa la transaminación enzimática de la harina de trigo para dejar solamente la fracción de las alfa-gliadinas no tóxicas. Esta reacción enzimática se obtiene a través de la incubación de harina de trigo comercial con transglutaminasa microbiana y lisina metil éster (46).

3. Suplementos enzimáticos orales. Los residuos del gluten son altamente resistentes a la degradación por las proteasas gástricas y pancreáticas. Las glutenasas son endopeptidasas que están diseñadas para identificar y destruir los residuos de gluteninas y gliadinas, y por tanto disminuir la inmunotoxicidad del gluten. En la actualidad existen glutenasas como suplementos enzimáticos que pueden ser usados conjuntamente con una dieta sin gluten para disminuir la toxicidad de la exposición accidental con gluten (47). Se han estudiado otras enzimas concretamente con la AN-PEP (propil-endopeptidasa derivada del *Aspergillus Níger*) que ingeridas con el pan, la AN-PEP se adhiere a los péptidos del gluten, concretamente las gliadinas,

procediendo a su digestión mecánica y química en el estómago. Además la AN-PEP elimina la habilidad del gluten de estimular las células T (48, 49). Posteriormente se ensayó otra enzima, la EP-B2, que también se activa bajo condiciones de acidez y es capaz de romper la glutenina. Se comprobó que una mezcla de ambas elimina la toxicidad del gluten bajo las condiciones duodenales y dentro de los 10min de su administración, evitando la reacción del sistema inmunitario y los consiguientes síntomas.

4. Ligantes poliméricos. Los ligantes poliméricos son moléculas de alto peso molecular diseñadas para secuestrar al gluten en el tracto gastrointestinal y por tanto prevenir la degradación, absorción y evitar la reacción inmunológica. La molécula Poly(HEMA-co-ss) es un ligante polimérico que se ha visto efectivo uniéndose a la  $\alpha$ -gliadina a pH representativos tanto del estómago como del duodeno (50, 51).

Otra de las estrategias que están en estudio es la modulación de la permeabilidad intestinal. El objetivo es reducir la permeabilidad intestinal.

1. La zonulina es el único modulador de las uniones estrechas entre las células de la pared del tracto digestivo descrito hasta el momento y está envuelta en el paso de las macromoléculas a través de la pared intestinal y por lo tanto en el balance de la tolerancia o la respuesta inmune (52). Los niveles de esta proteína aumentan con la ingesta de gliadinas del gluten tanto en el intestino de pacientes con EC como en pacientes no celiacos, aunque en el caso de la EC está marcadamente sobre expresada. La empresa ALBA Therapeutics está desarrollando un antagonista de los receptores de la zonulina, AT-1001 (Larazotide acetate), en febrero de 2014 terminó con éxito los ensayos clínicos de fase II. Este fármaco ingerido oralmente evitaría el

pasaje de residuos de la gliadina y la respuesta inmunológica de las células T. También se ha ensayado en animales con SII con resultados positivos, por lo que se estima que igualmente sería efectivo para tratar la SGNC.

2. Otra manera de modular la barrera intestinal es mediante la suplementación de nutrientes y probióticos con capacidad inmunomoduladora, estos pueden ayudar a regular las respuestas inmunológicas e inflamatorias y restablecer la barrera intestinal. Inmunomoduladores como aminoácidos (glutamina, arginina, triptófano y citrulina), ácidos grasos (cadena corta, omega-3 y ácido linoleico conjugado) y probióticos (*Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y *Lactobacillus*) son posibles compuestos que en la actualidad han sido estudiados por su efecto regulador de la permeabilidad intestinal (53). Los probióticos puede ser una terapia complementaria para los pacientes con SGNC. Se ha demostrado los efectos antiinflamatorios de la *Bifidobacterium infantis* en enfermos con EC. La presencia de cepas de *Bifidobacterias* durante la digestión intestinal produce secuencias diferentes y menos tóxicas de la gliadina modificando la respuesta inflamatoria e inhibiendo el aumento de la permeabilidad epitelial en el intestino (54). Se han realizado dos ensayos clínicos de una bacteria perteneciente al género de *Bifidobacterium longum*, primero con adultos y después con niños celíacos, observándose cambios en la composición de la flora intestinal y la reducción de la respuesta inflamatoria de forma significativa respecto al grupo que recibió placebo (55).

Por último, otro de los tratamientos estudiados es la introducción de la tolerancia al gluten mediante la vacunación, estrategia ampliamente utilizada en enfermedades alérgicas en la que el paciente se vacuna con dosis cada vez

mayores de un alérgeno con el objetivo de inducir tolerancia inmunológica. La vacuna Nexvax 2, combinación de tres péptidos (gliadina, hordeína y secalina), desarrollada por la empresa ImmusanT, los ensayos clínicos fase I presentan resultados positivos para aquellos pacientes con intolerancia al gluten con el haplotipo HLA-DQ2.

### **Conclusiones**

La SGNC es un trastorno que se enmarca dentro de los desórdenes relacionados con el gluten, cuyo elemento desencadenante es el consumo de gluten con una patogenia y clínica diferente a otros trastornos y enfermedades como el síndrome del intestino irritable y de la enfermedad celiaca, y con síntomas tanto gastrointestinales como extraintestinales.

En la SGNC no hay una disposición genética clara, tampoco hay definidos unos biomarcadores que se puedan utilizar para identificarla. Muchos autores reconocen que se está en un estado de conocimiento de este trastorno parecido al que se tenía hace 40 años con la enfermedad celiaca.

Parece que las gliadinas son las promotoras de la SGNC ya que se observan variaciones en la permeabilidad intestinal con su consumo tanto en este grupo de pacientes como en aquellos con la EC. También hay estudios que sugieren que podrían estar involucrados los FODMAPs (hidratos de carbono de cadena corta), así como los ATIs (inhibidores de la amilasa y la tripsina) componentes de las plantas que actúan como principal mecanismo natural para defenderse de plagas e insectos.

El incremento de la prevalencia de enfermedades relacionadas con el gluten podría ser paralelo al crecimiento de su consumo en las dietas actuales, no solo en la pasta y los productos panarios, sino también como aditivo en una



amplia variedad de alimentos. Aunque esta hipótesis está lejos de ser demostrada, se han desarrollado diferentes líneas de investigación desde el punto de vista nutricional y farmacológico con el objetivo de reducir o eliminar las consecuencias del consumo del gluten.

La SGNC, cuya prevalencia según algunos autores podría alcanzar el 6%, merece estimular a grupos de investigación en general y nutricionistas en particular a seguir trabajando en la presente temática; incluso la industria alimentaria, parte del problema y de la solución, tendría que intervenir en el uso racional del gluten en sus formulaciones, facilitar el etiquetado identificando respecto al contenido en gluten, e incluso tratar de poner en el mercado productos que utilicen las diferentes estrategias descritas de disminución del gluten en cereales, para ayudar a estos pacientes a mejorar no solo su salud sino también su calidad de vida, y así facilitar su integración social.

## **Bibliografía**

1. Catassi C, Anderson RP, Hill ID, Koletzko S, Lionetti E, Mouane N et al. World perspective on celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2012; 55(5):494-499
2. FAO. FAO Cereal Supply and Demand Brief del 03-12-2015. World Food Situation. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>
3. Shewry PR. *Wheat. J. Exp. Bot.* 2009; 60 (6): 1537–1553.
4. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 2012; 10: 13.
5. Cooper BT, Holmes GK, Ferguson R et al. Gluten-sensitive diarrhea without evidence of celiac disease. *Gastroenterology* 1980; 79: 801-6.
6. Digiacomio, DV, Tennyson, CA, Green PH, Demmer RT. Prevalence of gluten-free diet adherence among individuals without celiac disease in the USA: Results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2010. *Scand. J. Gastroenterol.* 2013; 48: 921–925.
7. Molina-Infante J, Santolaria S, Montoso M, Esteve M, Fernández-Bañares F. Sensibilidad al gluten no celiaca: una revisión crítica de la evidencia actual. *Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 37(6); 362-371.
8. Volta U, de Giorgio R. New understanding of gluten sensitivity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 9: 295–299.
9. Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology* 2013; 145(2):320.

10. Catassi C, Elli L, Bonaz B, Bouma G, Carroccio A, Castillejo G, et al. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients*. 2015;7(6):4966-77
11. Shahbazkhani B, Sadeghi A, Malekzadeh R, Khatavi F, Etemadi M, Kalantri E, et al. Non-Celiac Gluten Sensitivity Has Narrowed the Spectrum of Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. 2015;7(6):4542-54.
12. Makharia A, Catassi C, Makharia GK. The Overlap between Irritable Bowel Syndrome and Non-Celiac Gluten Sensitivity: A Clinical Dilemma. *Nutrients* 2015; 7(12): 10417-26.
13. Barmeyer C, Schumann M, Meyer T, Zielinski C, Zuberbier T, Siegmund B et al. Long-term response to gluten-free diet as evidence for non-celiac wheat sensitivity in one third of patients with diarrhea-dominant and mixed-type irritable bowel syndrome. *Int J Colorectal Dis*. 2016; 1-11
14. LA Anderson LA, McMillan SA, Watson RGP, Monaghan P, Gavin AT, FOX C, Murray LJ. Malignancy and mortality in a population-based cohort of patients with coeliac disease or gluten sensitivity. *World J. Gastroenterol*. 2007; 13(1):146-51.
15. Isasi C, Tejerina E, Morán LM. Non-celiac gluten sensibility and reumatologic diseases. *Reumatol. Clin*. 2015.
16. Porcelli B, Verdino V, Bossini L, Terzuoli L, Fagiolini A. Celiac and non-celiac gluten sensitivity: a review on the association with schizophrenia and mood disorders. *Autoimmun. Highlights* 2014; 5(2):55-61.
17. Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology* 2013; 145(2):320.
18. Gibson PR, Muir JG, Newnham ED. Other Dietary Confounders: FODMAPS et al. *Dig Dis* 2015;33:269–276.

19. Sapone A; Lammers KM, Mazzarella G, Mikhailenko I, Carteni M, Casolaro V, Fasano A. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: Gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010; 152:75–80.
20. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011; 9(1):23-.
21. Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, et al. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* 2011; 106(3):508–14.
22. Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients* 2015; 7(3):1565-76.
23. Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH et al. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut.* 2016; 0:1–8
24. Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M, et al. Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J. Clin. Gastroenterol.* 2012; 46(8):680.
25. Brottveit M, Beitnes AR, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen F, et al. Mucosal Cytokine Response After Short-Term Gluten Challenge in Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108(5):842-50.
26. Di Sabatino A, Giuffrida P, Fornasa G, Salvatore C, Vanoli A, Naviglio S et al. Innate and adaptive immunity in self-reported nonceliac gluten sensitivity versus celiac disease. *Dig Liver Dis.* 2016; (7):745-52
27. Non Celiac Gluten Sensitivity (búsqueda). Ensayos clínicos encontrados en el buscador oficial ClinicalTrials.gov: Un servicio del Instituto Nacional de Salud de

USA. [Internet: 23-10-2016].

<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Non+Celiac+Gluten+Sensitivity&Search=Search>

28. Vojdani A, Perlmutter D. Differentiation between Celiac Disease, Nonceliac Gluten Sensitivity, and Their Overlapping with Crohn's Disease: A Case Series. *Case Reports Immunol.* 2013;1-9.
29. Lionetti E, Leonardi S, Franzonello C, Mancardi M, Ruggieri M, Catassi C. Gluten Psychosis: Confirmation of a New Clinical Entity. *Nutrients.* 2015; 7(7):5532-9
30. Casella G, Pozzi R, Cicognetti M, Bachetti F, Torti G, Cadei M et al. Mood disorders and non celiac gluten sensitivity. *Gastroenterol Dietol.* 2016 Sep 20
31. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, et al. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann. Med.* 2010; 42(7):530-8.
32. Fardet A. Wheat-based foods and non-celiac gluten/wheat sensitivity: Is drastic processing the main key issue? *Med. Hypotheses* 2015; 85(6):934-9.
33. Peters SL, Biesiekierski JR, Yelland GW, Muir JG, Gibson PR. Randomised clinical trial: gluten may cause depression in subjects with non coeliac gluten sensitivity—an exploratory clinical study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014; 39(10): 1104-1112.
34. Di Sabatino A, Volta U, Salvatore C, Biancheri P, Caio G, De Giorgio R, et al. Small Amounts of Gluten in Subjects With Suspected Nonceliac Gluten Sensitivity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(9):1604
35. Elli L, Tomba C, Branchi F, Roncoroni L, Lombardo V, Bardella MT, et al. Evidence for the Presence of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Patients with Functional Gastrointestinal Symptoms: Results from a Multicenter Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Gluten Challenge. *Nutrients.* 2016;8(2).
36. Schuppan D, Zavallos V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. *Dig. Dis.* 2015; 33(2):260-3.

37. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 2012;209(3): 2095-2408.
38. Schuppan D, Pickert G, Ashfaq-Khan M, Zevallos V. Non-celiac wheat sensitivity: differential diagnosis, triggers and implications. *Best practice&research. Clin. Gastroenterol.* 2015; 29(3):469.
39. Zevallos V, Junker Y, Hebich B, Rüssel N, Schuppan D. Sa1309 Isolation of Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitors From Various Plants and Their Ability to Activate Innate Immunity in Celiac Disease. *Gastroenterology.* 2012;142(5): S-269
40. Vasil IK. Molecular genetics improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum L.*). *Plant Cell Rep.* 2007; 26(8):1133-54.
41. Reglamento (CE) núm. 41/2009 de la Comisión, de 20 de enero de 2009, sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten.
42. Castillo NE, Theethira TG, Leffler DA. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol. Rep.* 2015; 3(1):3-11.
43. Stoven S, Murray JA, Marietta E. Celiac disease-advances in treatment via Gluten modification. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 10(8):859-862.
44. Molina-Rosell C. Alimentos sin gluten derivados de cereales. En Rodrigo L y Peña AS, ed. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celiaca.* Barcelona. España: OmniaScience. 2013; pp. 447-461
45. Rizzello CG, Curiel JA, Nionelli L, Vincentini O, Di Cagno R, Silano M et al. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiol.* 2014; 37:59-68.
46. Heredia-Sandoval NG, Islas-Rubio AR, Cabrera-Chávez F, Calderón de la Barca AM. Transamidation of gluten proteins during the bread-making process of wheat flour to produce breads with less immunoreactive gluten. *Food Funct.* 2014; 5(8):1813-8.

47. Bethune MT, Khosla C. Oral enzyme therapy for celiac sprue. *Meth. Enzymol.* 2012;502:241.
48. Salden BN, Monserrat V, Troost FJ, Bruins MJ, Edens L, Bartholomé R, et al. Randomised clinical study: *Aspergillus Níger*-derived enzyme digests gluten in the stomach of healthy volunteers. *Aliment. Pharm. Ther.* 2015; 42(3):273-85.
49. Sestak K, Thwin H, Dufour J, Liu DX, Alvarez X, Laine D et al. Supplementation of Reduced Gluten Barley Diet with Oral Prolyl Endopeptidase Effectively Abrogates Enteropathy-Associated Changes in Gluten-Sensitive Macaques. *Nutrients.* 2016;8(7)
50. Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David CS, et al. The Copolymer P(HEMA-co-SS) Binds Gluten and Reduces Immune Response in Gluten-Sensitized Mice and Human Tissues. *Gastroenterology.* 2012;142(2):316,325.e12
51. McCarville JL, Nisemblat Y, Galipeau HJ, Jury J, Tabakman R, Cohen A. BL- 7010 demonstrates specific binding to gliadin and reduces gluten-associated pathology in a chronic Mouse model of gliadin sensitivity. *PLoS One.* 2014;9(11):e109972
52. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol. Rev.* 2011; 91(1):151.
53. Andrade MER, Araújo RS, de Barros PAV, Soares ADN, Abrantes FA, Generoso SdV, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clin. Nutr.* 2015; 34(6):1080-7.
54. Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J. Cell Biochem.* 2010; 109(4):801-7.
55. Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br. J. Nutr.* 2014; 112(1):30-40.

Figuras y tablas

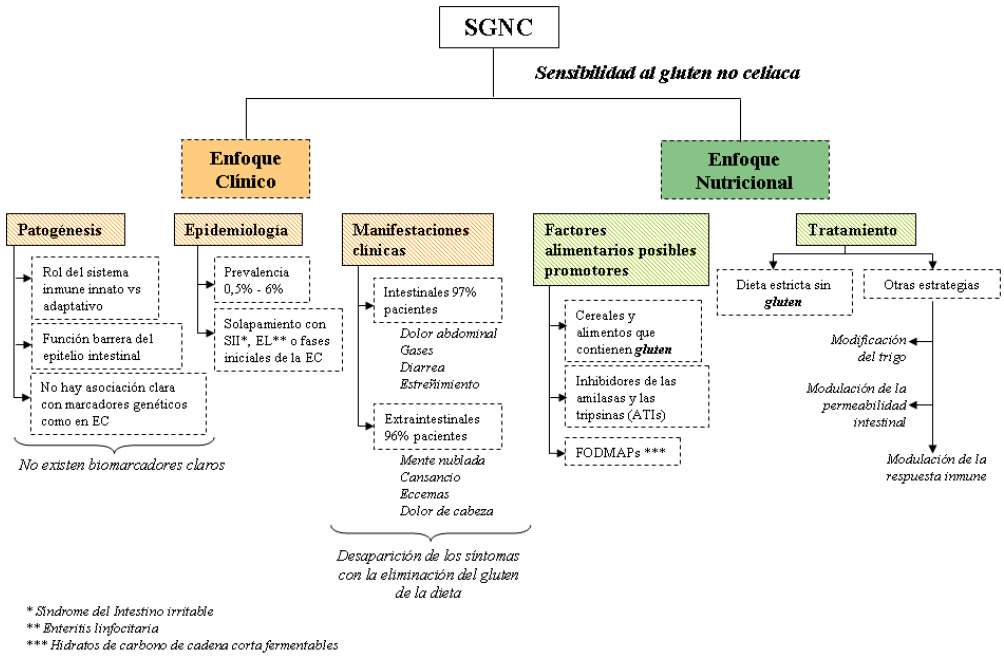


Figura 1: Esquema del alcance de la revisión

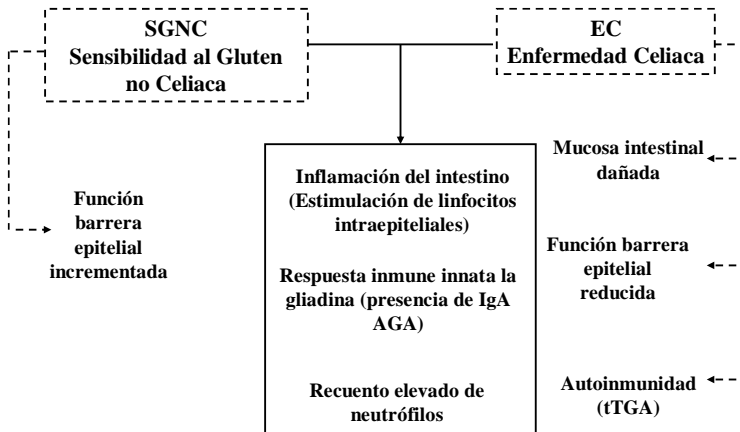


Figura 2: Mecanismos patogénicos de la SGNC y la EC según Sapone et al.



**Tabla 1:** Marcadores de la EC y valores obtenidos para la SGNC

<b>Biomarcadores</b>	<b>Enfermedad celiaca</b>	<b>Sensibilidad al gluten no celiaca</b>
Serología EC		
Transglutaminasa (tTGA)	Positivo	Negativo
Anticuerpos Antigliadina IgG	Positivo	Positivo (50% de los casos)
Anticuerpos IgA antiEmA	Positivo	Negativo
Anticuerpos IgG gliadina deaminada	Positivo	Negativo
Histología duodenal	Positiva	Negativa o con un nº moderado de linfocitos intraepiteliales
Haplotipos HLA (DQ2-DQ8)	Presente (95% - 5%)	Ausente/presente

**Tabla 2:** Principales estudios de prevalencia realizados

Referencia / país	Muestra	Prevalencia
Biesiekierski et al., 2011 Australia	<b>37</b> Adultos con SII (se descarta que padecen EC)	Frecuencia de la SGNC en pacientes con SII: <b>28%</b>
Tanpowpong P., 2012 Nueva Zelanda,	<b>916</b> Niños 78% etnia europea	Prevalencia: <b>5%</b> mejoran los síntomas con la eliminación del gluten sin diagnóstico de EC
Carroccio et al., 2012 Italia	<b>920</b> adultos con SII Realizado durante los años 2001-2011	Frecuencia de la SGNC en pacientes con SII: <b>30%</b>
Centre for celiac Disease. Univ. Maryland USA	<b>5.896</b> adultos Realizado durante los años 2004-2010	Prevalencia: <b>6%</b>
Digiacomio, DV USA (NHANES), 2013	<b>7.762</b> adultos Realizado durante los años 2009-2010	A partir de un cuestionario se estima una prevalencia de <b>0.548%</b> Mayor en mujeres
Aziz et al., 2014 Reino Unido	<b>1.002</b> adultos	Cuestionario autocontestado: 13% con sensibilidad al gluten, incluido EC. 79% mujeres – edad media 39,5 21% hombres En base a un posterior diagnóstico de exclusión: de 200 pacientes el 93% se identifica SGNC: <b>18,5%</b>
Volta et al., 2014 Italia	<b>12.255</b> pacientes (rango de 3 a 81 años) Realizado durante 2012-2013	Prevalencia: <b>3,19%</b> 84% mujeres Edad media 38 años

**Tabla 3:** Síntomas de la SGNC

Síntomas SGNC	Prevalencia
<b>Gastrointestinales</b>	<b>96%</b>
Dolor abdominal	77%
Gases	72%
Diarrea	40%
Estreñimiento	18%
<b>Extraintestinales</b>	<b>96%</b>
Mente nublada	77%
Cansancio	72%
Eccemas	40%
Dolor de cabeza	18%

**Tabla 4:** Diferentes vías para el tratamiento nutricional y farmacológico para tratar SGNC

Estrategia	Objetivo	Mecanismos estudiados
Modificación de la dieta	Dieta sin gluten	Eliminación de la dieta del trigo, cebada, centeno y avena o sus variedades híbridas, o alimento que lo contenga
Modificación del trigo	Reducción de la inmunotoxicidad del gluten	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Eliminación del gluten o sustitución del gluten</li> <li>2. Pretratamiento enzimática de la harina de trigo</li> <li>3. Suplementos enzimáticos orales</li> <li>4. Ligantes poliméricos</li> </ol>
Modulación de la permeabilidad intestinal	Restaurar la función de la barrera intestinal, reduciendo la permeabilidad y restableciendo la mucosa intestinal	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reducción de la concentración de la Zonulina</li> <li>2. Ingesta de nutrientes y probióticos con capacidad inmunomoduladora</li> </ol>
Modulación de la respuesta inmune	Inducción de la tolerancia inmunológica	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Vacunación de tres péptidos: gliadina, secalina y hordeína</li> <li>2. Tratamiento con lombrices del cerdo (<i>Trichuris suis</i>) o nematodo gastrointestinales (<i>Necator americanus</i>)</li> <li>3. Inhibición de receptores citoquímicos específicos</li> </ol>

**Tabla 5:** Alimentos prohibidos en las dietas sin gluten

<b>Alimentos con gluten</b>	<b>Alimentos que pueden contener gluten</b>
<p>Pan, harinas de trigo, cebada, centeno, avena o triticale</p> <p>Productos manufacturados en los que en su composición figure cualquiera de las harinas citadas y en cualquiera de sus formas: almidones, almidones modificados, féculas, harinas y proteínas</p> <p>Bollos, pasteles, tartas y demás de productos de pastelería</p> <p>Pastas (fideos, macarrones, tallarines, etc.) y sémola de trigo</p> <p>Bebidas malteadas</p> <p>Bebidas destiladas o fermentadas a partir de cereales: cerveza, agua de cebada, algunos licores, etc.</p>	<p>Embutidos</p> <p>Productos de charcutería</p> <p>Yogures de sabores y con trocitos de fruta</p> <p>Quesos fundidos, en porciones, de sabores</p> <p>Patés diversos</p> <p>Conservas de carne</p> <p>Conservas de pescado con distintas salsas</p> <p>Caramelos y gominolas</p> <p>Sucedáneos de café y otras bebidas de máquina</p> <p>Frutos secos fritos y tostados con sal</p> <p>Helados</p> <p>Sucedáneos de chocolate</p> <p>Colorante alimentario</p>



## **3.2 Los inhibidores de las amilasas y las tripsinas en el trigo y otros cereales potenciales activadores de los efectos de la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC)**





**J. Med. Food. 2017; 21(3), 207-214.**

**Amylase - trypsin inhibitors in wheat and other cereals as potential activators of the effects of non-celiac gluten sensitivity (NCGS)**

Authors: Y. Reig-Otero, J. Mañes , L. Manyes\*

Departamento de Medicina Preventiva i Salut Pública. Facultat de Farmàcia.  
Universitat de València. 46100 Burjassot (Spain)

\*Corresponding autor:

Lara Manyes

Laboratory of Food Chemistry and Toxicology. Facultat de Farmàcia.  
Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot  
(Spain)

Telephone: +34963543057

e-mail: lara.manyes@uv.es



## **ABSTRACT**

*Non-celiac gluten sensitivity (NCGS) is a gluten-related gastrointestinal disorder distinct from celiac disease (CD) and gluten allergy (GA) that is not easy to diagnose due to the lack of biomarkers. It is characterized by intestinal symptoms and extraintestinal manifestations with the consumption of gluten-containing foods. In contrast to CD, NCGS patients do not present a genetic predisposition or intestinal villi atrophy. Recent studies question the pro-inflammatory triggering activity of  $\alpha$ -gliadin fraction contained in wheat, since it has been demonstrated that the amylase/trypsin inhibitors (ATIs), exert a strong activating effect upon the innate immune response. We aimed to analyze the role of ATIs in the activation of innate immunity and in the development of the symptoms characteristic of NCGS.*

*A systematic literature search was made using databases such as Medline, Scielo, Science Direct and Scopus, with focus on key words such as "amylase/trypsin inhibitors", "wheat", "gluten", and "celiac". Many studies are available on the structure, inhibition mechanism and immune system effects of ATIs, mainly focused on IgE-mediated reactions. Recently, with the increase of NCGS interest, has increased the literature on the capacity of ATIs contained in wheat to activate the innate immune system.*

*Literature published to date questions the relationship between activation of the innate immune system and gluten in NCGS. ATIs may have acted as interfering contaminant of gluten and appear as potential activator of innate immunity in NCGS patients. In view of their potential impact, more interventional studies are needed to demonstrate the pro-inflammatory effect of ATIs.*

## **KEYWORDS**

*Alpha-Amylases/Trypsin Inhibitors; Gluten sensitivity; Gluten; Immunity Innate; Wheat;*

## **INTRODUCTION**

*Non-celiac gluten sensitivity (NCGS)* is a gluten-related disorder broadly defined as a reaction to gluten in which both allergic and autoimmune gastrointestinal mechanisms have been discarded (diagnosis through exclusion).<sup>1</sup>

The disease is characterized by intestinal symptoms (diarrhea or constipation, abdominal pain, meteorism, postprandial fullness, etc.) and extraintestinal manifestations (headache, fatigue, depression, muscle pain, dermatitis, anemia, etc.) in patients with no evident diagnosis of celiac disease (CD) or gluten allergy (GA). These patients experience notorious improvement with a gluten-free diet (GFD), and the symptoms return when gluten is reintroduced.<sup>2-4</sup> The prevalence of NCGS is unclear - the few available data ranging from 0.6% to 10%.<sup>5,6</sup>

*At present there are no clear diagnostic biomarkers for NCGS.* The diagnosis can only be established through the exclusion of other disorders once negative diagnostic test results have been obtained mainly for CD and GA. In view of the lack of such biomarkers and the need to standardize a diagnostic protocol, in 2014 the *Third International Expert Meeting in Gluten Related Disorders* reached consensus as to how the diagnosis of NCGS should be confirmed. A two-step protocol was defined, comprising a first step involving the follow-up of patients with GFD, and a second step in which the effect of gluten reintroduction in the diet is assessed.<sup>7</sup> The lack of a strict diagnostic criterion has resulted in overlapping identification of irritable bowel syndrome (IBS) and NCGS.<sup>8,9</sup> NCGS symptoms usually are diagnosed under the umbrella of the IBS (bloating, abdominal pain and irregular bowel movements). IBS reactions have been related to gluten, lactose, milk protein and FODMAPs.<sup>10</sup> NCGS patients, however, often report symptoms like headache and/or foggy mind, which cannot be related for by lactose, and/or FODMAPs intolerance.

While the pathogenic mechanism underlying CD has been clearly related to T cell activation in the gastrointestinal mucosa, *the pathogenesis of NCGS remains unclear*.<sup>10,11</sup> Celiac disease is an autoimmune disorder in which genetic predisposition plays an important role, being strongly linked to class II human leukocyte antigens HLA-DQ2 and HLA-DQ8. In CD both innate and adaptive immunity play a key role in the development of the disease, *while in NCGS only activation of the innate immune response appears to be implicated*. The absence of gluten-reacting T cells in NCGS and the lack of an association to the HLA complex, suggest that the immune system does not behave in the same way as in CD.<sup>12</sup> *The Toll-like receptors TLR2 and, to a lesser degree TLR1 and TLR4, are considerably increased in NCGS compared with CD*. These receptors play a key role in the detection of pathogens and in initiation of the innate inflammatory response.<sup>13</sup>

The gluten gliadin fraction, and especially  $\alpha$ -gliadin and  $\gamma$ -gliadin, *is largely responsible for the effects of EC*, since most of the T cells specific of HLA-DQ2 or HLA-DQ8 appear to recognize this fraction. It was initially believed that this fraction could be one of the promoters of the symptoms observed in NCGS, though doubts remain as to whether these proteins are truly responsible for triggering the innate immune symptoms of NCGS. Thomas and Sapone et al. analyzed the role of the innate immune response in CD and came to an important conclusion that *could link the innate response in NCGS to other proteins distinct from gliadin*: pepsin - trypsin digested gliadin (PT-gliadin) does not activate the TLR2 or TLR4 receptors, and the observed innate immune response is not due to possible contamination by the lipopolysaccharide (LPS) used as control.<sup>1.14</sup> In 2011, Fassano et al., in a review of the implication of zonulin in the regulation of intestinal permeability, deduced the process whereby the innate and adaptive immune mechanisms are activated in CD.<sup>15</sup> In coincidence with Thomas et al., they described the start of interaction between

gliadin and the myeloid cells as being dependent upon MyD88 but independent of TLR4 and TLR2.

These studies suggest that other components of wheat could also be implicated in the onset of symptoms in NCGS. In particular, the amylase - trypsin inhibitors (ATIs) have been shown to be potent activators of the innate immune system response.<sup>16</sup> A study published in 2012 on the activation of the innate immune response with wheat described the role of ATIs and concluded that the latter are potent stimulators of TLR4 in the intestine.<sup>17</sup> This was regarded as relevant not only in relation to CD but probably also in NCGS, as well as perhaps in other gastrointestinal disorders. In this study, Junker et al. *demonstrated that ATIs contained in wheat and other cereals are potent activators of macrophages, monocytes and dendritic cells, as evidenced in duodenal biopsies from celiac patients and in murine models.* Without entirely discarding other possible signaling pathways dependent upon gliadin, these authors found that cytokine proinflammatory activity was not induced with the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -gliadin fractions, which constitute 90% of the total gliadins, but was indeed induced with the  $\omega$ -gliadin fraction. Mass spectrometry analysis of this fraction showed it to be contaminated with a 15 kDa protein found to correspond to ATIs, and this was identified as the factor responsible for activation of the TLR4-MD2-CD14 complex, producing important effects upon the innate immune system both *in vitro* and *in vivo*.

The ATIs represent approximately 4% of the total wheat proteins and are highly resistant to the intestinal proteases. They are defense proteins of wheat, affording protection against pests and parasites by inhibiting their digestive enzymes.<sup>18</sup> Furthermore, there are important differences in ATI content among the different varieties of wheat.<sup>19</sup> The genes that encode for these inhibitors are

considered to be useful in genetic engineering, and transgenic wheat over-expressing ATIs has already been developed.<sup>20</sup> On the other hand, these proteins act as promoters of different allergies. Specifically, current data point to ATIs as the main culprit of so-called baker's asthma.<sup>21</sup>

We are at a crucial point, since research is currently attempting to clarify how and why symptoms activation occurs in this disease condition. What we do know currently is that NCGS exists as a condition differentiated from CD and GA, that an overlapping in the diagnosis with IBS can exist, and that the consumption of wheat and other cereals with gluten, act as promoters of the NCGS symptoms.

## **METHOD**

A systematic literature search was made using several data bases as Medline, Scielo, Science Direct and Scopus. Initially, the terms searched were ("amylases" OR "amylase") AND "trypsin" AND ("inhibitors" OR "protease inhibitors" OR "protease inhibitor"). Finally the terms "wheat" and "celiac" were included in the title or abstract. Documents types were clinical trials, case reports, reviews and conference proceedings. The initial search returned 1,094 articles, after adding "wheat" term they were 163 and "celiac" term 16 studies. Other relevant articles related to innate immunity and celiac disease were also reviewed without the inclusion of ATIs terms.

## **RESULTS**

### **$\alpha$ -Amylase - trypsin inhibitors**

The ATIs comprise a group of low molecular weight proteins with the capacity to inhibit amylases and/or proteases of different origins. They play an important role in protecting the cereal. The ATIs were first isolated from wheat in

1973, and since then interest in these proteins has grown due to their implication in different immunoglobulin IgE-mediated allergies and to the possible use of genetic engineering techniques to manipulate these proteins with a view to improving transgenic crop resistance to pests and pathogens.<sup>20,21,22,24</sup> Since their first description, many studies have been published on the structure, exogenous protease inhibition mechanism and immune system effects of ATIs.<sup>21,22,25 - 28</sup>

The grains of wheat and of other cereals such as barley and rye contain ATIs. These have been identified through selective extraction with chloroform/methanol mixtures. However, they have also been extracted with aqueous solutions, saline solutions and alcohol/water mixtures. Wheat ATIs comprise 12-16 kDa polypeptide units with a secondary structure characterized by 4-5 intramolecular disulfide bonds or S-S bridges that afford a three-dimensional structure essential for ensuring high resistance to human digestion mediated by the gastrointestinal proteases trypsin and pepsin. All ATIs in nature contain 10 cysteine residues that form the disulfide bonds present in their structure.<sup>26</sup> In addition to their protective function in the cereal, ATIs accumulate in large amounts in the grain endosperm, with additional functions as reserve proteins. In contrast to gluten, which contains high percentages of glutamine and proline, ATIs have a more balanced amino acid composition, with higher lysine contents. Consequently, these proteins partly compensate the essential amino acid deficiencies in gluten proteins and represent an important nutrient reserve for plant growth and human nutrition.<sup>29</sup>

Based on their aggregation state, three types of  $\alpha$ -amylase inhibitors can be identified with activity against insects, dust mites and mammalian  $\alpha$ -amylases, but not against the enzymes of the cereal itself. These molecules include monomeric inhibitors, also known as protein 0.28; homodimeric inhibitors, also known as



proteins 0.19 and 0.55; and heterotetrameric inhibitors, also known as CM proteins. The trypsin inhibitors are monomeric, and are also known as CMx inhibitors.<sup>25,29.</sup>

Many studies in the last decade have attempted to identify the diversity of sequences of the different inhibitors found in wheat. Such information is crucial, since inhibitors with a 98% coincidence in their sequence may present different specificities against  $\alpha$ -amylases from different insects and mammals. No modified wheat crops are currently in production, though as early as 2009 cereals had been developed capable of being placed on the market, and which in the last decade have been expanded upon to produce different specific characteristics.<sup>30</sup> Although most of these projects have not reached the production stage because of great social pressures, they soon will be found in the fields.<sup>31</sup> China is betting heavy to transgenic crops, in 2015 the authorities of that country approved the seeding of a number of experimental genetically modified wheat varieties, beginning in 2016. These include several wheat strains resistant to viruses and insects, with improved tolerance of drought and of salt and alkaline soils; high-yield wheat; and efficient nitrogen and phosphorus utilization.<sup>32</sup> According to the advocates of genetically modified wheat, this technology is an attractive alternative to the use of pesticides and insecticides, and can contribute to reduce the allergenic potential, as through gliadin modification.<sup>33</sup>

The term "wheat" encompasses a great variety of cultivated species and genotypes of the genus *Triticum*. Each wheat genotype produces different types and amounts of gluten, ATIs and fructans. Accordingly, each wheat variety could be assigned a reactivity profile indicating the potency and amount of epitopes that prove reactive to consumption.<sup>34</sup> Protein and fructan expression may even change according to the environment in which the plant is grown. In periods of drought, ATIs

inhibit starch degradation and facilitate its accumulation within the cells involved in adjustment of the osmotic balance - thereby affording protection against damage caused by insects. The endosperm has been found to contain high levels of these inhibitors (about 11% of the total proteins), which protect the starch from degradation in periods of little rain, and are over-expressed in more drought-resistant genotypes.<sup>35</sup>

Common hexaploid wheat (*T. aestivum L. ssp. aestivum*), comprises three genomes (A, B and D) derived from its ancestor species. The oldest cultivated wheat is einkorn (*T. monococcum L. ssp. monococcum*), which is diploid and only comprises A genome. The tetraploid species share A and B genome with common wheat, and include emmer (*T. turgidum L ssp.dicoccum*), durum (*T. turgidum L. ssp durum*), rivet (*T. turgidum L ssp turgidum*), and khorasam or kamut wheat (*T. turgidum L. ssp turanicum*). *The genes encoding for  $\alpha$ -amylase inhibitor are located on chromosomes 3BS and 3DS of wheat, while there is no evidence of the existence of the A genome.*<sup>36</sup> Since einkorn wheat lacks genomes B and D, no inhibition of human  $\alpha$ -amylases has been detected through either immunotransference testing or mass spectrometry studies.<sup>37,38</sup>

### **ATIs and their relation to NCGS**

Innate immunity represents the first barrier of defense against infection by pathogens. It lacks of specificity makes it effective against a large number of pathogenic agents. When innate immunity proves unable to stop the infectious process, disease occurs while the specific adaptive immune response starts to develop. *Toll-like receptors (TLRs) play a key role in the detection of pathogens and in activating the innate inflammatory response.* In humans they comprise a family of 10 receptors with specificity for different pathogens, sending signals that activate

the macrophages, causing them to secrete proinflammatory cytokines and other substances that attract effector cells.

One of the aims of research in CD has been to clarify the mechanism by which innate immunity is activated - this being a prerequisite for generation of the adaptive immune response with subsequent evolution towards an autoimmune disorder. The gluten gliadin fraction, and especially  $\alpha$ -gliadin and  $\gamma$ -gliadin, *is largely responsible for the activation of adaptive immunity in EC*, since most of the T cells specific of HLA-DQ2 or HLA-DQ8 derived from the small bowel biopsies of celiac patients appear to recognize this fraction.<sup>39</sup> *The activation of the innate immune response in CD is still the subject of research*, though it has been estimated that different factors intervene. In this regard, the role of the gluten gliadin fraction is subject to debate. Thomas and Sapone et al. concluded that there is a mechanism dependent upon adaptor protein MyD88 whereby gliadin induces zonulin release, causing a loss in intestinal epithelium tight junction integrity.<sup>14</sup> This allows gliadin access to the macrophages of the submucosa, which in turn release proinflammatory cytokines. Using pepsin - trypsin digested gliadin (PT-gliadin) as reagent, these authors observed no activation of the TLRs. According to these investigators, the innate immune response observed with PT-gliadin is independent of TLR4 and TLR2. In 2011, Fassano et al., in a review of the implication of zonulin in the regulation of intestinal permeability, deduced the process whereby the innate and adaptive immune mechanisms are activated in CD.<sup>15</sup> In coincidence with Thomas et al. and other authors as Palová-Jelínková et al., they also concluded that gliadin-mediated activation of the innate immune system is independent of the TLRs.<sup>40</sup> They suggested that *other wheat components could play an important role as gliadin adjuvants, activating the innate immune system via TLR4 and TLR2.*

Although both innate and adaptive immunity play a key role in the development of CD, *only activation of the innate immune response has been observed in the studies on NCGS carried out to date.* In the study published by Sapone et al. in individuals with symptoms characteristic of NCGS, *mainly TLR2 and - to a lesser degree - TLR1 and TLR4* were found to be considerably elevated in the intestinal mucosa of patients with NCGS versus those with CD. For this reason *it could be thought that the gluten gliadin fraction is not the initiator of the symptoms in NCGS.*<sup>1</sup>

Both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that the ATIs contained in wheat strongly induce the innate immune response, with the activation of macrophages, monocytes and dendritic cells through the TLR4-MD2-CD14 pathway. The study carried out by Junker et al. identified the tetrameric inhibitor CM3 and dimeric inhibitor 0.19 as potent TLR4 receptor activators - interaction of the ATIs with TLR4 being the most important signaling pathway in immune reactions to wheat.<sup>17</sup> These authors observed no activity referred to the gliadins, and reduction of the disulfide chains in the ATIs completely eliminated the stimulatory activity of the wheat fractions that contain them. This activity was detected on characterizing the inflammatory activity of the different gliadin fractions ( $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\omega$ ) digested with pepsin and trypsin. Neither  $\alpha$ -gliadin nor  $\gamma$ -gliadin showed stimulatory activity - the latter being limited the  $\omega$ -gliadin fraction. Coomassie blue staining showed that only this fraction contained a low molecular weight protein of 15 kDa. Its mass spectroscopic characterization showed it to contain members of the CM3 and 0.19 family. These results could indicate that *ATIs may have acted as a contaminant in gluten and in the different gliadin fractions prepared as reagents in the experiments.*

*Table 1* describes some of the studies made over the last 10 years, analyzing the relationship between innate immunity and TLR expression in CD. One of these studies also includes individuals with NCGS. Toll-like receptor expression is seen to be highly variable. Some studies have reported no difference in these receptors versus controls, while other studies have observed greater receptor expression in patients with remitting or active CD versus controls. In turn, some authors have found TLRs to be expressed in patients with NCGS but not in individuals with CD. These contradictory results confirm that *the role of innate immunity in CD is not clear* - in the three studies using PT-gliadin, no significant TLR expression is detected versus controls.

On analyzing the double-blind, placebo-controlled studies carried out to differentiate NCGS from other disorders such as CD or irritable bowel syndrome, it is seen that they have made use of gluten-containing flours (specifically wheat) added to different foods (tomato soup, biscuits manufactured with gluten-free flour but added with low-carbohydrate wheat protein, etc.)(Table 2), and in this respect, the effects of gluten may be confused with those of other wheat proteins such as ATIs. Two recent studies have administered gluten capsules.<sup>48,49</sup> The first made use of "purified wheat gluten", without specifying the purification method involved, percentage purity or the protein composition. In contrast, the second study did analyze the proteins contained in wheat gluten, identifying a protein with a molecular weight of under 17 kDa.

Amylase - trypsin inhibitors are closely linked to other cereal proteins and have been identified in fractions obtained through selective extraction with chloroform/methanol, aqueous solutions, saline solutions and alcohol/water mixtures. *It is clearly questionable whether the activation of the innate immunity*

*observed in individuals with NCGS who consume gluten-containing foods can be attributed to gluten itself.* Two of the randomized, double-blind, placebo-controlled studies in individuals with NCGS and irritable bowel syndrome made by the same authors, one published in 2011 and the other in 2013, show incoherent results.<sup>10,45</sup> The first study related the gastrointestinal symptoms of the patients to gluten intake, while the second publication found no association between the symptoms and gluten exposure. The investigators attributed these differences to the fact that the gluten used in the two studies may have been different, since the suppliers were not the same. They moreover commented that although the gluten contents were similar, the different proteins of the gluten fraction in the samples were not characterized. As a result, the investigators explain that proteins such as ATIs could have been implicated in the first study.

Moreover, the *Third International Expert Meeting in Gluten Related Disorders* recognized that no adequate vehicle has yet been developed for introducing gluten in clinical trials with the purpose of avoiding the possible overlap of FODMAPs, gluten and the proinflammatory activity of ATIs.<sup>1,7</sup>

## **DISCUSSION**

Food processing has a fundamental impact upon the digestibility and inflammatory activity of the end food product.<sup>51</sup> A number of studies have attempted to *quantify the inflammatory activity of ATIs in processed wheat-containing foods in IgE-mediated allergic disorders* such as baker's allergy or wheat allergy. One of these studies analyzed inflammatory activity to different parts of bread before and after baking in wheat-sensitive individuals. The tests performed found that the 16 kDa protein loses its allergenic capacity after processing.<sup>52</sup> Another study involving raw and cooked wheat concluded that ATIs are not destroyed after

exposing wheat samples to a cooking process and remain present in the three protein fractions according to the Osborne classification - with preservation of their allergenic potential.<sup>53</sup> More recently, Mamone et al., compared the digestibility and immunological potential of raw and cooked pasta proteins.<sup>54</sup> In this study, LPS were found to be resistant to both protease action and cooking, while although ATIs proved resistant to hydrolysis under raw conditions, they were fully recovered in cooking water.

Although no studies on the activity of ATIs in processed foods in individuals with NCGS have been found, a research group from the University of Mainz has developed a cellular bioassay to quantify the capacity of ATIs to activate the innate immune system, based on measurement of the concentrations of IL-8 and other cytokines released in cell cultures.<sup>55,56</sup> Such bioactivity was analyzed in relation to different wheat varieties and other natural sources of these inhibitors. The inhibitors found in wheat, barley and rye exhibit the greatest bioactivity in terms of cytokine release. Indeed, their activity is up to 100-fold greater than in other cereals or foods that do not contain gluten. Among the different wheat varieties, the oldest strains, emmer wheat, have less activity than modern wheat or kamut.<sup>56,57</sup> This research group has found that an ATI content of 5% by weight was seen to develop inflammatory activity, and this activity was found to be dose-dependent.<sup>56</sup> Likewise, in gluten-free cereals, the bioactivity is dependent not only on their percentage weight but also on the cultivation and processing conditions involved. The activity of quinoa cultivated in the Andes is far lower than that of modern wheat (< 5%), but is 10% higher than in samples cultivated at sea level.<sup>59</sup> Furthermore, in contrast to wheat, cereals without gluten, experience a 60% decrease in bioactivity following digestion with pepsin and trypsin.

According to the reviewed literature, there is a clear link between ATIs and gluten-containing foods, with association to the three wheat protein fractions. By removing gluten from the diet, we would be eliminating much of the cause of innate immune system activation in individuals with NCGS, even when the origin of the symptoms is not the  $\alpha$ -gliadin protein fraction. In future, would it be feasible to have food products and diets with little or no ATIs? Could we recommend wheat-based foods but with little or no ATI bioactivity, such as for example einkorn wheat?<sup>56,60</sup> No interventional studies have been published to date analyzing the proinflammatory effects of ATIs, all previous studies on this activity have been carried out in murine models and in cell cultures.<sup>55-59</sup> A clinical study that currently is recruiting participants has the aim to analyze the palatability and tolerance of different breads in individuals with NCGS. One of them is bread low in ATIs. (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02308397).<sup>61</sup>

Other no less important issues subjected to study include the reason why such innate immune system activation causes adverse effects in some individuals but not in others. Since there is no genetic origin, it is possible that the immune system of individuals with NCGS has been weakened by previous disease processes, and that ATIs worsen the symptoms of pre-existing inflammatory disorders.<sup>56</sup> Other possibilities are intestinal mucosal alteration by parasitic, bacterial or viral infections, or intestinal floral imbalance or dysbiosis, or non-exposure of the developing immune system to allergens in childhood.<sup>62,63</sup> These issues need to be addressed in order to define adequate treatment strategies for patients with NCGS.



## **CONCLUSION**

In contrast to celiac disease, where both the innate and the adaptive immune systems are involved, NCGS is characterized only by activation of the innate immune system. The capacity of ATIs to activate the innate immune system is increased in gluten-containing cereals such as wheat, barley and rye, and is 100-fold greater than in other cereals and plant species that do not contain gluten. The response is dose-dependent, and the latter in turn may vary for one same food depending on the characteristics of the region where the crop is grown and on the type of processing involved. The three Osborne wheat protein fractions (albumins/globulins, glutenins and gliadins) have been found to contain ATIs. These consequently may have acted as interfering contaminants in the studies carried out to investigate the link between gluten and NCGS. The scientific literature published to date questions the relationship between activation of the innate immune system and gluten in patients with NCGS.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors declare no conflict of interest. The authors thank the University of Valencia for the scientific and economic support to their research.

## **DISCLOSURE STATEMENT**

No competing financial interests exist

## REFERENCES

1. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 2012;10:13.
2. Lionetti E, Leonardi S, Franzonello C, et al. Gluten Psychosis: Confirmation of a New Clinical Entity. *Nutrients.* 2015;7(7):5532-5539.
3. Isasi C, Tejerina E, Morán LM. Non-celiac gluten sensitivity and rheumatic diseases. *Reumatol Clin* 2016;12(1):4-10.
4. Porcelli B, Verdino V, Bossini L, et al. Celiac and non-celiac gluten sensitivity: a review on the association with schizophrenia and mood disorders. *Auto Immun Highlights.* 2014;5(2):55-61.
5. DiGiacomo DV, Tennyson CA, Green PH, et al. Prevalence of gluten-free diet adherence among individuals without celiac disease in the USA: Results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2010. *Scand J Gastroenterol.* 2013;48(8):921-925.
6. Molina-Infante J, Santolaria S, Montoso M, et al. Sensibilidad al gluten no celiaca: una revisión crítica de la evidencia actual. *J. Gastroenterol Hepatol* 2014;37(6):362-371.
7. Catassi C, Elli L, Bonaz B, et al. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients* 2015;7(6):4966-4977.
8. Shahbazkhani B, Sadeghi A, Malekzadeh R, et al. Non-Celiac Gluten Sensitivity Has Narrowed the Spectrum of Irritable Bowel Syndrome: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Nutrients* 2015;7(6):4542-4554.
9. Makharia A, Catassi C, Makharia GK. The Overlap between Irritable Bowel Syndrome and Non-Celiac Gluten Sensitivity: A Clinical Dilemma. *Nutrients* 2015;7(12):10417-10426.

10. Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, et al. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology* 2013;145(2):320.
11. Volta U, De Giorgio R. New understanding of gluten sensitivity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9(5):295-299.
12. Volta U, Caio G, De Giorgio R, et al. Non-Celiac gluten sensitivity: A work-in-progress entity in the spectrum of wheat-related disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2015;29(3):477-491.
13. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011;9:23.
14. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, et al. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol.* 2006;176(4):2512-2521.
15. Fassano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011;91(1):151-175.
16. Schuppan D, Zevallos V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. *Di. Dis.* 2015; 33(2): 260-263.
17. Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 2012;209(13):2095-2408.
18. Ryan CA.. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 1990;28:425–449.

19. Wang JR, Zhang L, Wei YM, et al. Sequence polymorphisms and relationships of dimeric  $\alpha$ -amylase inhibitor genes in the B genomes of Triticum and S genomes of Aegilops. *Plant Sci.* 2007;173(1):1-11.
20. Vasil IK. Molecular genetics improvement of cereals: transgenic wheat (Triticum aestivum L.). *Plant Cell Rep.* 2007; 26(8):1133-1154.
21. Salcedo G, Quirce S, Diaz-Perales A. Wheat allergens associated with Baker's asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2011; 21(2): 81-92.
22. Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ et al. Structural, biological, and evolutionary relationships of plant food allergens sensitizing via the gastrointestinal tract. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(5):379-407.
23. Silano V, Pocchiari F, Kasarda DD. Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. *Biochim Biophys Acta.* 1973;317(1):139-48.
24. Pastorello EA, Farioli L, Conti A, et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patines alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144(1):10-22.
25. Altenbach SB, Veshel WH, Dupont FM. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Res Notes.* 2011;4:242.
26. Carbonero Z, García-Olmedo F. A multigene family of trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors from cereals. In: Sherry R, Casey R, eds. *Seed proteins*: Netherland: Springer Science, pp.1999:617-633.
27. Payan F. Structural basis for the inhibición of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2004;1696(2):171-180.

28. Huebener S, Tanaka CK, Uhde M, et al. Specific nongluten proteins of wheat are novel target antigens in celiac disease humoral response. *J Proteome Res* 2015; 14(1):503-511.
29. Sherry R, Casey R. Seed proteins. Netherland: Springer Science, 1999.
30. Dunwell JM. Transgenic cereals: Current status and future prospects. *J Cereal Sci* 2014;59(3):419-434.
31. Monsanto says biotech wheat moves closer to market. AG Profesional. [www.agprofessional.com/news/Monsanto-says-biotech-wheat-moves-closer-to-market-239302961.html](http://www.agprofessional.com/news/Monsanto-says-biotech-wheat-moves-closer-to-market-239302961.html) (accessed 02 March 2016)
32. Genetically Modified Wheat - different views between China and US to be enlarged. CCM - China Chemicals Market. [www.cnchemicals.com/Press/82479-Genetically%20Modified%20Wheat%20 %20different%20views%20between%20C hina%20and%20US%20to%20be%20enlarged.html](http://www.cnchemicals.com/Press/82479-Genetically%20Modified%20Wheat%20%20different%20views%20between%20C hina%20and%20US%20to%20be%20enlarged.html) (Accessed 2 March 2016)
33. Morandini P. Inactivation of allergens and toxins. *N Biotechnol* 2010; 27(5):482-493.
34. Kucek LK, Veenstra LD, Amnuaycheewa P, et al. A grounded guide to gluten: how modern genotypes and processing impact wheat sensitivity. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2015;14(3):285-302.
35. Gu A, Hao P, Lv D, et al. Integrated Proteome Analysis of the Wheat Embryo and Endosperm Reveals Central Metabolic Changes Involved in the Water Deficit Response during Grain Development. *J Agric Food Chem* 2015;63(38):8478-8487.
36. Wang JR, Yan ZH, Wei YM, et al. Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS. *J Cereal Sci* 2006; 43(3):360-368.

37. Capocchi A, Muccilli V, Cunsolo V, et al. A heterotetrameric alpha-amylase inhibitor from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *Phytochemistry* 2013;88:6-14.
38. Zoccatelli G, Segal M, Bolla M, et al. Expression of  $\alpha$ -amylase inhibitors in diploid *Triticum* species. *Food Chem* 2012;135(4):2643-2649.
39. Castillo NE, Theethira TG, Leffler DA. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2015;3(1):3-11.
40. Szebeni B, Veres G, Dezsőfi A, et al. Increased Mucosal Expression of Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;45(2):187-193.
41. Cseh Á, Vásárhelyi B, Szalay B, et al. Immune Phenotype of Children with Newly Diagnosed and Gluten-Free Diet-Treated Celiac Disease. *Dig Dis Sci*. 2011;56(3):792-798.
42. Kalliomäki M, Satokari R, Lähteenoja H et al. Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(6):727-732.
43. Palová-Jelínková L, Dáňová K, Drašarová H, et al. Pepsin digest of wheat gliadin fraction increases production of IL-1 $\beta$  via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway and an NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One* 2013;8(4):e62426.
44. Cooper BT, Holmes GK, Ferguson R, et al. Gluten-sensitive diarrhea without evidence of celiac disease. *Gastroenterology*. 1980;79(5):801-806.
45. Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, et al. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: A double-blind

- randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(3):508-514.
46. Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, et al. Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(12):1898-1906.
47. Peters SL, Biesiekierski JR, Yelland GW, et al. Randomised clinical trial: gluten may cause depression in subjects with non-coeliac gluten sensitivity – an exploratory randomised clinical study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(10):1104-1112.
48. Di Sabatino A, Volta U, Salvatore C, et al. Small amounts of gluten in subjects with suspected non-celiac gluten sensitivity: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015;13(9):1604-1612.
49. Elli L, Tomba C, Branchi F, et al. Evidence for the presence of non-celiac gluten sensitivity in patients with functional gastrointestinal symptoms: Results from a multicenter randomized double-blind placebo-controlled gluten challenge. *Nutrients* 2016;8(2):84.
50. Zanini B, Baschè R, Ferraresi A, et al. Randomised clinical study: gluten challenge induces symptom recurrence in only a minority of patients who meet clinical criteria for non-coeliac gluten sensitivity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015 ;42(8):968-976
51. Wagner M, Morel MH, Bonicel J, et al. Mechanisms of heat-mediated aggregation of wheat gluten protein upon pasta processing. *J Agric Food Chem.* 2011;59(7):3146-3154.
52. Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, et al. Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergic proteins.

- A study with bread dough, crumb and crust. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5668-5673.
53. Pastorello EA, Farioli L, Conti A, et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;144(1):10-22.
54. Mamone G, Nitride C, Picariello G, et al. Tracking the fate of pasta (T. Durum Semolina) immunogenic proteins by in vitro simulated digestion. *J Agric Food Chem.* 2015;63(10):2660-2667.
55. Zevallos V, Junker Y, Hebich B, et al. Sa1309 Isolation of alpha-amylase/trypsin inhibitors from various plants and their ability to activate innate immunity in celiac disease. *Gastroenterology.* 2012;142(5):S-269.
56. Zevallos V, Raker V, Tenzer S, et al. Nutricional wheat amylase-trypsin inhibitors promote intestinal inflammation via activation of myeloid cells. *Gastroenterology.* 2017;152(5):1100-1113.
57. Zevallos V, Kahn M, Tenzer S, et al. 1990 Cereal alpha-amylase/trypsin inhibitors (ATIs) as nutritional triggers of innate immunity: Bioactivity in various foods. *Gastroenterology* 2014;146:S-348.
58. Zevallos V, Bros M, Montermann E, et al. Sa1394 Wheat Alpha-amylase/trypsin inhibitors in commercial gluten as activators of dendritic cells. *Gastroenterology* 2016;150:S303-4.
59. Zevallos V, Herencia I, Schuppan D. Tu1381 Gluten-free crops can contain proteins with innate immune stimulatory capacity: Influence of environmental factors. *Gastroenterology* 2016;150:S890.



60. Hidalgo A, Brandolini A. Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *J Sci Food Agric.* 2014;94(4):601-612.
61. Bakery Products for Non-Coeliac Gluten Sensitive Consumers. ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02308397?term=wheat+sensitivity&rank=14> (Accessed 10 March 2016)
62. Pickert G, Becker C, Wirtz S, et al. Su1895 Nutritional wheat alpha-amylase/trypsin inhibitors negatively affect intestinal microbiota and promote intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* 2016;150:S582.
63. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, et al. Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell* 2016;165(4):842-853.

**Table 1:** Studies about Toll-like receptor expression and innate immunity relation in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity.

<b>Author/title</b>	<b>Study objectives</b>	<b>Sample</b>	<b>Results in relation to TLRs</b>
<b>Szebeni et al.</b> <sup>40</sup> <i>Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in celiac disease</i>	Characterization of the expression of TLR2, TLR3 and TLR4	Duodenal biopsy in children with CD before treatment in the form of <b>GFD</b> ; children with treated CD and control Expression of mRNA and protein levels	↑↑ TLR2/4 CD patients with and without GFD vs control  ↑↑ TLR2/4 CD patients without GFD vs with GFD
<b>Cseh et al.</b> <sup>41</sup> <i>Immune phenotype of children with newly diagnosed and gluten-free diet-treated celiac disease</i>	Prevalence of the most important receptors in innate and adaptive immunity	Blood sample in children with recently diagnosed CD, before and after <b>GFD</b>	↑↑ TLR2/4 CD without GFD vs control  ↑↑ TLR2 CD with GFD vs control
<b>Sapone et al.</b> <sup>13</sup> <i>Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity.</i>	Comparison of genes associated to epithelial barrier function and innate and adaptive immunity in individuals with CD and NCGS	Small bowel biopsies in patients with CD and active NCGS, and controls	↑ TLR2, TLR1 CD vs control, though nonsignificant ↑↑ TLR2 NCGS vs control ↑ TLR1 and TLR4 NCGS vs control. ↑ TLR1,2,4 NCGS vs CD

**Table 1:** Continuation.

<b>Author/title</b>	<b>Study objectives</b>	<b>Sample</b>	<b>Results in relation to TLRs</b>
<b>Kaliomaki et al.</b> <sup>42</sup> <i>Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease.</i>	Evaluation of the microbiota, its receptors (TLRs) and TLR regulators in individuals with CD	Small bowel biopsies in children with untreated CD, children with normal intestinal mucosa (controls) and adults with CD subjected to <b>GFD</b>	There were no significant differences in TLR2 between the treated individuals and controls

**Table 2:** Summary of effects of gluten administration in double-blind placebo-controlled studies with non-celiac gluten sensitivity patients.

<b>Author/title</b>	<b>Study objectives</b>	<b>Gluten administration</b>	<b>Non gluten food supplemented</b>	<b>Effects of gluten administration</b>
<b>Cooper et al.</b> <sup>44</sup> <i>Gluten-sensitive diarrhea without evidence of celiac disease.</i>	Presentation of a group of patients with chronic diarrhea, sensitivity to gluten, and who did not appear to have CD	Tomato soup supplemented with gluten-containing flour (20 g/day)	Tomato soup supplemented with gluten-free flour	Significant worsening of the intestinal symptoms in the week in which gluten-containing flour was introduced vs control week
<b>Biesiekierski et al.</b> <sup>45</sup> <i>Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial.</i>	Determination of whether gluten intake can induce symptoms in non-celiac individuals, with evaluation of the mechanism	Gluten-free biscuits / bread supplemented with low-carbohydrate wheat protein (16 g/day) Wheat protein distribution was 2.3% albumin / globulin, 45.7% glutenin and 52.0% gliadin	Gluten-free biscuits / bread	Significant worsening of all the symptoms in patients who consumed wheat protein vs gluten-free biscuits / bread

**Table 2:** Continuation.

<b>Author/title</b>	<b>Study objectives</b>	<b>Gluten administration</b>	<b>Non gluten food supplemented</b>	<b>Effects of gluten administration</b>
<b>Carroccio et al.</b> <sup>46</sup> <i>Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: Exploring a new clinical entity.</i>	Demonstration of the existence of gluten sensitivity and definition of clinical, serological and histological markers	Capsules containing wheat flour (13 g/day)	Capsules containing xylose	Significant worsening of the gastrointestinal symptoms in the weeks in which gluten-containing capsules were administered vs weeks without wheat consumption
<b>Biesiekierski et al.</b> <sup>10</sup> <i>No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates</i>	Investigation of the specific effects of gluten after FODMAPs reduction in the diet of individuals believed to have NCGS	Food with high wheat gluten content (16 g/day) or low content (2 g/day) with FODMAPs reduction. Wheat protein distribution was 6.6% albumin / globulin, 53.4% glutenin and 40.0% gliadin	Gluten-free foods with soya protein or placebo	Significant improvement of the intestinal symptoms in the weeks with low-wheat protein diet

**Table 2:** Continuation.

<b>Author/title</b>	<b>Study objectives</b>	<b>Gluten administration</b>	<b>Non gluten food supplemented</b>	<b>Effects of gluten administration</b>
<b>Peters et al.</b> <sup>47</sup> <i>Randomised clinical trial: gluten may cause depression in subjects with non-celiac gluten sensitivity - an exploratory clinical study</i>	Investigation of whether the greater effect of gluten in individuals with NCGS is subjective and not necessarily related to GS	Foods with high wheat gluten content (16 g/day) with FODMAPs reduction. Wheat protein distribution was 6.6% albumin / globulin, 53.4% glutenin and 40.0% gliadin	Gluten-free foods with soya protein or placebo	Similar worsening of the intestinal symptoms with both placebo and wheat protein diet Increased symptoms with depression associated to wheat protein diet
<b>Di Sabatino et al.</b> <sup>48</sup> <i>Small amounts of gluten in subjects with suspected non-celiac gluten sensitivity: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial.</i>	Determination of the effects of low doses of gluten in individuals suspected to have NCGS.	Capsules containing purified wheat gluten (4.375 g/day)	Capsules containing rice starch	Significant worsening of all the symptoms after gluten intake vs placebo

**Table 2:** Continuation.

Author/title	Study objectives	Gluten administration	Non gluten food supplemented	Effects of gluten administration
<p><b>Elli et al.</b> <sup>49</sup>  <i>Evidence for the presence of non-celiac gluten sensitivity in patients with functional gastrointestinal symptoms: Results from a multicenter randomized double-blind placebo-controlled gluten challenge</i></p>	<p>Identification of subjects with NCGS among the patients with functional gastrointestinal symptoms</p>	<p>Daily intake of 5.6 g of gluten, equivalent to 80 g of pasta The supplied gluten contained 83% protein  <b><i>Analysis of this fraction identified a small proportion corresponding to a protein with a molecular weight of under 17 kDa</i></b></p>	<p>Capsules containing rice starch</p>	<p>In the group of individuals with gastrointestinal symptoms, 14% suffered symptoms relapse during the gluten ingestion period</p>

**Table 2:** Continuation.

Author/title	Study objectives	Gluten administration	Non gluten food supplemented	Effects of gluten administration
<p><b>Zannini et al</b> <sup>50</sup>  <i>Randomised clinical study: gluten challenge induces symptom recurrence in only a minority of patients who meet clinical criteria for non-coeliac gluten sensitivity</i></p>	<p>To assess gluten sensitivity in patients diagnosed with NCGS.</p>	<p>Sealed sachets with gluten-containing flour to be sprinkle over pasta or Soup.                      One sachet/ each day during 10 consecutive days</p>	<p>Idem with gluten-free containing flour (including lactose and maize starch)</p>	<p>1/3 of patients with recognised criteria for NCGS have sensitivity to gluten. 2/3 of the participants were unable to identify the flour containing gluten. Their GSRS scores increased, after the gluten-free flour challenge, but not after the gluten-containing flour challenge. The explanation for this is unclear. However, they may be sensitive to a component of the flour, besides gluten as FODMAPs</p>



### **3.3 Análisis de los inhibidores de las $\alpha$ -amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal**



**Rev. Toxicol. 2018; 35: 45 – 52.**

**Análisis de los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal**

*Analysis of Amylase/Trypsin's Inhibitors contained in wheat and other cereals: potential promoters of intestinal inflammation.*

Autores: Reig-Otero Y., Juan C., Mañes J., Manyes L\*.

Departamento de Medicina Preventiva i Salut Pública. Facultat de Farmàcia.  
Universitat de València. 46100 Burjassot (Spain)

**\*Autor responsable de la correspondencia:**

Dra. Lara Manyes

Departamento de Medicina Preventiva i Salut Pública. Facultat de Farmàcia.  
Universitat de València

Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Spain)

Telephone: +34963543057

e-mail: lara.manyes@uv.es



## **Resumen**

Las plantas han desarrollado un sistema de resistencia a insectos y plagas mediante la síntesis de compuestos como los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas y/o las proteasas digestivas, proteínas que actúan también contra las enzimas digestivas de mamíferos. Diversos estudios han demostrado su implicación en la activación del sistema inmune y posiblemente, en la sintomatología de patologías como la Sensibilidad al Gluten no Celíaca, siendo esta reacción proporcional al contenido en el cereal. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las diferentes estrategias para la extracción, purificación, detección y cuantificación de estas proteínas en el trigo y en otros cereales de la dieta actual. Esta revisión incluyó los métodos de análisis con espectrometría de masas del periodo 2000 – 2017, identificándose 114 artículos relevantes de los que se seleccionaron 26. Actualmente no existe un método estandarizado de control que permita determinar estas proteínas de forma clara, concisa y fiable.

## **Palabras clave:**

Proteínas de las plantas; Inhibidores de las proteasas; Hipersensibilidad al trigo; Enfermedad Celíaca; Espectrometría de Masas

## **Abstract**

*Plants have developed a system of resistance to insects and pests through the synthesis of certain compounds such as alpha-amylase inhibitors and/or digestive proteases, proteins that can also act against digestive enzymes of mammals. Studies have shown their involvement in the activation of the immune system and possibly in the symptomatology of non-coeliac Gluten Sensitivity, being the reaction proportional to cereal content. The objective of this study was to review the different strategies used for extraction, purification, detection and quantification of these inhibitors in wheat and other cereals of the current diet. A review of the literature published between 2000-2017 on methods of analysis by mass spectrometry was carried out. 114 relevant articles were identified from which 26 were selected for review. At present, there is no standardized control method for the clear, concise and reliable determination of these proteins.*

## **Key Words:**

*Plant Proteins; Protease Inhibitors; Wheat Hypersensitivity; Celiac Disease; Mass Spectrometry*

## *INTRODUCCIÓN*

Los cereales y las legumbres son la base alimentaria en nuestra dieta actual. Los cereales son la fuente más importante de nutrientes contribuyendo al 50% de las calorías de la dieta (Keraney, 2010). Las legumbres constituyen la fuente principal de proteínas en Latinoamérica, África y este de Asia (Flight y Clifton, 2006). Se han asociado varios compuestos de estos alimentos con mecanismos de defensa contra la depredación de insectos y la resistencia a la infección, como la familia de los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas y las proteasas, proteínas que actúan inhibiendo las enzimas digestivas de los insectos y en algunos casos inhibiendo la de los mamíferos (Dang y Van Damme, 2015). Son moléculas tridimensionales formada por uniones disulfuro y se presentan como estructuras monómericas de 5 a 16 kDa, homodiméricas de 26 kDa o tetraméricas de 50 kDa (Franco et al., 2002). Debido a su naturaleza proteica son termolábiles, se desnaturalizan con el calor durante el cocinado, aunque se ha comprobado que no pierden totalmente la capacidad de inhibición (Zevallos et al., 2017; Pastorello et al., 2007).

Los primeros inhibidores aislados fueron el inhibidor Kunitz y Bowman-Birk de la soja en 1940 y el inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa de cereales (Kneen y Sandstedt, 1943; Kunitz, 1945; Bowman, 1946). Desde entonces se han identificado y caracterizado numerosos inhibidores en un amplio espectro de especies vegetales debido principalmente al interés en modificar su expresión para el control de las plagas o para tratar la diabetes y la obesidad (Vasil, 2007; Barrett y Udani, 2011; Dang y Van Damme, 2015). Recientemente se han vinculado los inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa y la tripsina (ATIs) del trigo y de otros cereales con diversas patologías gastrointestinales, como la Enfermedad Celíaca (EC) y la Sensibilidad al Gluten no

Celíaca (SGNC), por ser fuertes activadores de la respuesta del sistema inmune innato (Junker et al. 2012; Zevallos et al., 2017; Reig-Otero et al., 2017).

En 1943 se observó por primera vez que una proteína del endospermo del trigo era capaz de inhibir la amilasa salival y desde que se aislaron en 1973, se han relacionado con reacciones de hipersensibilidad IgE, como el asma del panadero y la alergia al trigo, así como en reacciones alérgicas cruzadas entre el trigo y el arroz (Silano et al., 1973; Mills et al., 2004; Salcedo et al., 2011; Junker et al. 2012; Villalta et al., 2012). Desde entonces se han publicado estudios para entender su estructura, el mecanismo de inhibición y su efecto sobre el sistema inmunitario (Carbonero et al., 1999; Payan 2004; Salcedo et al., 2011; Altenbach et al., 2011; Huebener et al., 2015).

En base al estado de agregación se pueden encontrar varios tipos de inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa en el trigo (figura 1): monoméricos o proteínas 0.28, homodiméricos o proteínas 0.19 y 0.55, y los heterotetraméricos, referidos como proteínas CM. Los inhibidores de la tripsina son monoméricos o inhibidores CMx (Sherry y Casey, 1999).

La posible implicación de estas proteínas en la EC, la SGNC y otras enfermedades inflamatorias, precisa disponer de las mejores técnicas instrumentales para su detección y cuantificación, así como de mecanismos para medir la actividad proinflamatoria del SGI (sistema gastrointestinal) de los cereales crudos y de los alimentos que los contienen. El mayor problema que existe es la inexistencia de procedimientos fiables de análisis y la ausencia de estudios interlaboratorio que los validen.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las técnicas más recientes de extracción, purificación, detección y cuantificación de los ATIs mediante



espectrometría de masas (MS) principalmente del trigo y de otros cereales tanto en crudo como en alimentos procesados.

### *METODOLOGÍA*

Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura científica existente relacionada con los ATIs de cereales. Para la revisión se consideró artículos desde el año 2000, utilizando bases de datos documentales de revistas indexadas como Medline, Scielo, Science Direct y Scopus, con el diagrama de flujo y criterios de búsqueda según se muestra en la figura 2. Finalmente se utilizaron 26 artículos para esta revisión bibliográfica.

### *RESULTADOS*

Existen dos técnicas para detectar y cuantificar las proteínas con propiedades alergénicas en alimentos: MS y enzimoimmunoensayos. De estos últimos, la más utilizada es el ensayo ELISA basado en el reconocimiento de anticuerpos monoclonales o policlonales de una o más proteínas alergénicas, no requiere instrumental sofisticado ni altos niveles de experiencia, pero tiene desventajas como falsos positivos y baja sensibilidad (Croote y Quake, 2016). La MS es óptima cuando se requiere la confirmación de la composición, estructura y secuencia de aminoácidos. Tiene gran selectividad y alta sensibilidad, hay escasa posibilidad de falsos positivos, pero el coste es elevado y necesita personal cualificado (Monaci y Visconti, 2009; Mari et al., 2010).

En esta revisión se distinguen dos estrategias de análisis mediante MS (figura 3), una identifica los ATIs con potencial alergénico por inmunotransferencia, se aíslan y posteriormente se caracterizan por MS (Pastorello et al., 2007; Akagawa et al., 2007; Šotkovský et al., 2011; Lang et al., 2013; Goliáš et al., 2013), la otra estrategia identifica y cuantifica los péptidos característicos resultado de la digestión

de las proteínas por técnicas de MS (Fontanini et al., 2007; Prandi et al., 2013; Uvackova et al., 2013; Flodrová et al., 2015; Satoh et al., 2016).

En la primera (figura 3A), una vez extraídas las proteínas, purificadas y digeridas con tripsina, se realiza un ensayo de inmunotransferencia con suero de pacientes sensibles. Las proteínas reactivas se analizan por MS, se comprueba el % de cobertura con patrones y se obtiene la secuencia mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS). En esta estrategia la clave es disponer del biomarcador que indique una alteración del sistema gastrointestinal (SGI). En la alergia al trigo se utilizan los anticuerpos IgE y en la EC los anticuerpos IgG y IgA, en el caso de SGNC todavía no hay biomarcadores característicos.

En la segunda (figura 3B), se cuantifican por MS las mezclas de los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas extraídas y purificadas. La cuantificación de proteínas en matrices complejas requiere la fragmentación en péptidos, esto trae consigo varias suposiciones: que el proceso de extracción y separación son óptimos, y que la digestión es completa y reproducible, es decir, existe una relación entre la concentración de los péptidos y de la proteína original (Ong y Mann, 2005; Li et al., 2017). Para dar valores cuantitativos del contenido en ATIs es necesario estándares semejantes a la muestra a analizar de los cuales se conozca su concentración en la matriz a estudiar, así como tener un criterio único en las unidades facilitando la comparación de los resultados de los diversos trabajos (Elliot et al., 2009; Sancho y Mills, 2010; Wang y Giese, 2017).

#### *Revisión de las técnicas de extracción de los ATIs*

En cualquier proceso analítico la eficacia del análisis depende en gran medida del método de extracción y de la pureza de la fracción extraída. Se realiza sobre el cereal molturado por separación de las proteínas en base a diferencias de

solubilidad en varios solventes hasta conseguir la máxima pureza de la fracción concreta. Como se detalla en las tablas 1, 2 y 3, son mayoritarios los trabajos que identifican los ATIs sobre la fracción de las albúminas/globulinas (85%), aunque se hayan identificado en la fracción de las gliadinas y gluteninas, como el estudio realizado por Pastorello et al. (2007), donde se detectaron en las tres fracciones, siendo en las albúminas/globulinas donde se encontró la concentración mayor.

De acuerdo con la revisión realizada, la extracción se hace mayoritariamente de la fracción soluble en soluciones salinas (NaCl 1M, NaCl 0.5M, Tampón Fosfato Salino, etc.), albúminas/globulinas. Cuccioloni et al. (2016), optimizaron el método de extracción sobre las gliadinas usando un disolvente al 50% de isopropanol (1:5 p/v), seguido por una cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) con columnas cargadas de iones Cu(II). Este método presentó un 95% de recuperación de los ATIs frente al uso de la mezcla acetona/isopropanol. Por otra parte, Flodrová et al. (2015), valoraron el potencial alergénico de las proteínas sobre la fracción de las albúminas del trigo y la cebada en crudo y procesada. Según estos autores la mayoría de los alérgenos en alimentos son proteínas solubles en agua (Robinson y Pongracic, 2012).

Otro trabajo estudió la solución más eficaz para la extracción de alérgenos del arroz, concluyendo que los ATIs se encuentran mayoritariamente en la fracción de albúminas/globulinas y que la mayor concentración se obtiene con la solución compuesta de NaCl 1M en Tris-HCl 30mM a pH 8.0 o pH 6.8 (Akagawa et al., 2007). La identificación mejor de los alérgenos del arroz sobre las proteínas totales fueron las basadas en una mezcla de Tris-HCl, SDS, 2-mercaptoetanol y urea porque generaban menores interferencias en la cuantificación.

Zevallos et al. (2017) utilizaron otros métodos de extracción para confirmar la activación del sistema inmune innato por parte de los ATIs donde utilizaron una solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM sobre muestras de varios cereales y alimentos procesados y sin procesar. Tres extracciones consecutivas seguidas de la precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y posterior diálisis consiguieron una pureza >60%.

La solución extractante afecta al método de análisis posterior, los agentes desnaturalizantes y concentraciones de sales elevadas para mejorar la extractabilidad son interesantes para el ensayo ELISA, pero tienen efectos negativos en la identificación por MS ya que influyen en la ionización del analito reduciendo considerablemente la intensidad de la señal (Kitta et al., 2006). En único ensayo interlaboratorio encontrado en esta revisión, Satoh et al. (2016), demostraron que, aunque la solución basada en urea (8 M Urea, 4% (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato) CHAPS, 60 mM DTT) consigue una mayor extracción de proteínas de semillas de arroz, con soluciones salinas basadas en NaCl se consigue la mejor representación de las proteínas en las bandas de electroforesis.

#### *Métodos de separación y purificación de los ATIs*

Como se observa en las tablas 1, 2 y 3, el 69% de los artículos utiliza la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), método que permite la separación de proteínas en una muestra compleja de acuerdo con su movilidad electroforética. El 31% emplea una segunda electroforesis, mayoritariamente de isoelectroenfoque (IEF), técnica que permite el fraccionamiento de proteínas en su estado nativo por su punto isoeléctrico (pI). En la mayoría de los casos se utiliza la LC de forma previa y/o posterior a esta etapa para mejorar del fraccionamiento.

Pastorello et al. (2007), con el fin de extraer y purificar los alérgenos en el rango de 9 kDa - 16 kDa del trigo realizaron una primera purificación de las albúminas/globulinas, en función del peso, por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las fracciones correspondientes a los picos individuales se concentraron y se pasaron por una columna de filtración en gel. Los diferentes picos obtenidos fueron analizados por SDS-PAGE y aquellos que contenían proteínas de 9 y 16 kDa fueron purificados, en base a su polaridad, por HPLC de fase reversa (PRC-HPLC), obteniendo, en muestras separadas, proteínas transportadoras de lípidos (LPTs) (9kDa) y los ATIs (12-16kDa) en cantidad y pureza suficiente para utilizarlas en los test de reactividad y confirmar su efecto alérgeno.

Akagawa et al. (2007), utilizaron una electroforesis bidimensional (E2D) para evaluar los alérgenos del trigo sobre la fracción total de las proteínas. Primero mediante IEF, la primera dimensión (1D), y después por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de litio (LDS-PAGE) para la segunda dimensión (2D). Concluyen que la E2D da información de hasta 18 proteínas IgE reactivas, entre ellas varios ATIs. No obstante, ciertos ATIs no se detectaron, posiblemente porque en la 2D las proteínas no migraron debido a la agregación, precipitación o asociación después de la 1D. Un trabajo anterior demostró que una electroforesis de electroisoelectroforesis con gradiente de pH inmovilizado (IPG) seguida por una electroforesis en gel de poliacrilamida-ácido acético-urea (AU-PAGE) permitía la detección de alérgenos alimentarios de bajo peso molecular, consiguiendo una resolución elevada especialmente para proteínas inferiores a 15kDa (Kitta et al., 2006). Según los autores, con este método, dos proteínas con tamaño similar pero diferentes cargas se pueden separar.

En otro estudio se valoró si la E2D diferencial cuantitativa con tinción fluorescente (2D-DIGE), tiene buena reproducibilidad para identificar y determinar las familias de alérgenos, los resultados obtenidos para la familia de los ATIs no eran consistentes (Sato et al., 2016). Al igual que concluyen Akagawa et al. (2007), una vez que las proteínas alcanzan su pI en la 1D, los puentes disulfuro se regeneran induciendo la formación de macroagregados que luego se entrelazan y no pueden entrar en las fibras de gel de poliacrilamida en la 2D y migrar a su respectiva masa molecular.

Un estudio de 2011, optimiza el proceso de aislamiento combinando una separación por peso molecular, una electroforesis y una segunda purificación por cromatografía (Šotkovský et al., 2011). La separación por peso molecular se realiza por ultrafiltración consecutiva de las proteínas (100kDa, 30kDa y 10kDa). Posteriormente a la separación por SDS-PAGE, se somete cada una de las fracciones a una purificación por IEF. Con aquellas que mostraron complementariedad con los anticuerpos IgE de pacientes sensibles al trigo, se realizó una segunda purificación por HPLC. La ventaja de este procedimiento es que puede modificarse fácilmente para el aislamiento de diversos alérgenos cambiando el intervalo pI en la IEF o el perfil de elución del HPLC.

#### *Métodos de detección de ATIs*

La técnica ampliamente utilizada para identificación de las proteínas y determinación de la secuencia de aminoácidos es la MS debido a su capacidad de cuantificar con alta sensibilidad múltiples proteínas en matrices complejas (Monaci y Visconti, 2009; Croote y Quake, 2016). Antes de someter las proteínas a la detección por MS y una vez realizada la de separación, las bandas que se encuentran sobre 14-16kDa son utilizadas para una digestión enzimática, normalmente con

tripsina, obteniéndose los péptidos característicos (Han et al., 2008; Monaci y Visconti, 2009). En un trabajo realizado para identificar el inhibidor CM3 en diferentes variedades de trigo, Prandi et al. (2013), observaron que la digestión con tripsina no generaba resultados satisfactorios. La ruptura del total de las proteínas se alcanzó con una digestión en dos fases, la primera con pepsina (0-180 min.) y la segunda con una mezcla de tripsina/quimiotripsina (180-420 min.).

Para la identificación y cuantificación de los ATIs se utilizan diferentes técnicas y combinaciones de MS como se observa en las tablas 1, 2 y 3. De los 17 artículos revisados que utilizan MS, el 74% utiliza fuentes de ionización *soft-ionization*, MALDI y electrospray, ESI.

Pastorello et al. (2007), utilizaron ambos espectrómetros para identificar los alérgenos más importantes del trigo. Después de una separación por SDS-PAGE y digestión enzimática, las bandas escindidas se analizaron mediante MALDI con detector tiempo de vuelo (TOF). En el caso de no identificar el péptido a partir del MALDI-TOF, se realizó la secuenciación *de novo* con un espectrómetro ESI-MS/MS en tándem. Mediante este proceso consiguieron identificar y secuenciar los inhibidores tetraméricos CM1, CM2, CM3 y CM16 del trigo crudo y cocido.

Ambas tecnologías se han utilizado también para aislar nuevos inhibidores. Por ejemplo, Fontanini et al (2007)., con el objetivo de identificar proteínas activas contra las amilasas humanas en la variedad de trigo Emmer o farro (*Triticum dicoccon* Schrank), utilizaron un MALDI-TOF para comprobar la similitud con los ATIs del trigo común (*Triticum aestivum*). Esta técnica no fue suficiente para discriminar determinados picos que no pudieron ser asignados a ningún fragmento conocido. Con un LC acoplado a un nano electrospray nESI-MS/MS se confirmó la existencia de dos inhibidores desconocidos hasta el momento EDI1 y EDI2.

Otro estudio sobre la avena (*Avena sativa*) identificó, usando una combinación RP-HPLC en tándem con un nESI-MS/MS, nuevos inhibidores en 11 especies de avena entre las cuales había genomas diploides y tetraploides con secuencias ortólogas a los ATIs del trigo. Treinta y siete AATI polipéptidos de alrededor de 14 kDa se agruparon en tres especies denominados AATI-1, AATI-2, y AATI-3 con estructuras primarias y pl diferentes. La secuencia de las proteínas AATI-1 y AATI-2 presentan un 55,5–60,0% de similitud con los ATIs CM1, CM2, y CM16 del trigo (Gazza et al., 2016).

#### *Análisis cuantitativo de los ATIs mediante MS*

Se han identificado tres trabajos que cuantifican los ATIs por MS. El primero lo hace de forma relativa utilizando la técnica de marcaje isobárico (iTRAQ). Esta técnica se había utilizado anteriormente para el análisis de diferentes sistemas celulares y para describir los cambios de la expresión de proteínas relacionadas con el cáncer, el Alzheimer y otras enfermedades siendo muy novedosa para cereales. Flodrová et al. (2015), la utilizaron para la comparación cuantitativa de alérgenos de bajo peso molecular (CM16, CM3, CM1, CMe, 0.19, BDAI-1y LTP) en el cereal crudo y en el procesado (trigo frente a cuscús y cebada frente a malta). Primero utilizan el espectrómetro MALDI-TOF MS/MS para la identificación de las proteínas de cada una de las muestras. Posteriormente para su cuantificación relativa por pares (crudo/procesado), realizan un marcaje iTRAQ seguido con el análisis MALDI-TOF MS/MS, observándose la diferencia de señal los ATIs entre los alimentos procesados comparados con el cereal en crudo. Se confirma que en ambos cereales la cantidad de alérgenos de bajo peso molecular disminuye en los procesados, siendo más de un 70% en el cuscús, con la excepción de dos ATIs (CM16, CM3) que aumentan ligeramente en la malta, posiblemente por error analítico.



En el segundo trabajo se cuantifica por primera vez de forma absoluta el ATI CM3 del trigo en diferentes variedades, observando grandes diferencias dependiendo no solo de la variedad sino del área de cultivo (Prandi et al., 2013). Se realiza utilizando como estándar un péptido de síntesis isotópicamente análogo a los péptidos marcadores de las muestras de trigo. Para ello Prandi y col, utilizaron un HPLC acoplado a un sistema híbrido de espectrómetro de masas OrbiTrap® y trampa iónica (HPLC-LTQ-OrbiTrap) para verificar la identidad del inhibidor CM3 del trigo duro separado por SDS-PAGE. La secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos de la digestión enzimática del extracto del total de proteínas fue identificada con un HPLC/ESI-MS/MS. Uno de los péptidos se usó como patrón para la determinación cuantitativa en un LC de ultra resolución (UPLC) acoplado a un ESI-MS, permitiendo conocer el contenido de CM3 en diferentes cultivares y zonas de cultivo, observándose importantes variaciones desde 0,22 a 1,11 mg por gramo de trigo.

Por último, Uvackova et al. (2013), utilizaron un UPCL en tándem con un MS con analizador cuádrupolo acoplado a un analizador tiempo de vuelo (QTOF-MS<sup>E</sup>) para el análisis cuantitativo de las proteínas alergénicas del trigo (Ishihama et al. 2005; Plumb et al., 2006). Los resultados son comparados con 76 proteínas alergénicas del trigo de diferentes especies, identificándose 15 proteínas del trigo potencialmente adversas a pacientes sensibles al trigo o celíacos, entre ellas varios ATIs (CM1, CM2, CM16 y CM17). La desviación estándar varía desde 11,3% al 165,7%, muy elevada comparada con la que se obtiene con el ensayo ELISA (< 6%), pero con valores de concentración para los ATIs similares a otros trabajos basados en MS.

## *DISCUSIÓN*

Los ATIs del trigo son unidades de polipéptidos de 12-16kDa que tienen una estructura secundaria con 4-5 puentes disulfuro, confiriéndoles una estructura 3D (Izumi et al., 1999; Carbonero et al., 1999). Esta configuración contribuye a su estabilidad, tanto en forma nativa como desnaturalizada, y a su elevada resistencia a las condiciones extremas del tracto gastrointestinal (Mills et al., 2004; Breiteneder, 2005). En los estudios revisados, se observa que los ATIs del trigo y de otros cereales no desaparecen después del procesado, aunque disminuyen su actividad proinflamatoria. Esta capacidad inflamatoria es multifactorial y depende de la variedad de partida, las condiciones de cultivo, el pretratamiento y el tipo de procesado (cocción, horneado, adicción de sal) y condiciones (temperatura, humedad, tiempo de permanencia) (Mills et al., 2004; Pastorello et al., 2007; Prandi et al., 2013; Zevallos et al., 2016). Todas estas variables podían ser moduladas y predeterminadas para desarrollar alimentos a base de trigo con menor contenido de ATIs y con menor poder de activación del sistema inmune.

Conocer los factores desencadenantes de la activación de la inmunidad innata en la EC con el consumo de cereales con gluten, dio lugar a un estudio que describe el papel de los ATIs en este mecanismo (Junker et al., 2012; Reig-Otero et al., 2017). Se observó que estas proteínas son potentes estimuladoras de los receptores tipo Toll (TLR por sus siglas en inglés) en el intestino, concretamente el TLR4. Los TLR tienen un papel central en la detección de patógenos y en la iniciación de la respuesta inflamatoria innata. Para comprobar esta actividad proinflamatoria de los ATIs, otro estudio verificó que es cien veces superior en cereales que contienen gluten y que se mantiene en el alimento una vez procesado, aunque es reducida frente al cereal sin procesar (Zevallos et al., 2017). La acción de los ATIs del trigo podría ser relevante para la explicación de la activación de la inmunidad innata

en la EC, también podría explicar la activación de los síntomas de la SGNC y, posiblemente, de otras patologías del SGI (Reig-Otero et al., 2017). Zevallos et al. (2016). demuestran *in vivo* un aumento de los niveles de las células dendríticas cuando los ratones son alimentados en concentraciones 12 veces menores que el valor medio de los ATIs ingeridos en la dieta normal de un individuo adulto, siendo estos niveles dependientes de la concentración de los ATIs, y que además tienen un efecto coadyuvante de los síntomas en modelos con inflamación intestinal previa.

Respecto a la avena, Gazza et al. (2016), identifican diferentes inhibidores en distintas especies de este cereal, algunas llegan a tener un 60% de similitud con los ATIs del trigo. Esta similitud podría ser la causa de que la avena aun siendo un cereal sin gluten, dependiendo de qué variedad o en qué condiciones se procese, exhiba distinta inmunoreactividad en pacientes con EC poniéndose en cuestión la seguridad del consumo de avena por enfermos celíacos.

Las técnicas de identificación de los ATIs durante estos últimos diez años se han ido optimizado. Un salto cualitativo se observa con la MS en la identificación inequívoca de las proteínas, y con MS en tándem, en la obtención de la secuencia de aminoácidos. El primer trabajo que utiliza la MS en un cereal es en 2000, a partir de entonces se utiliza como técnica imprescindible para análisis (Iulek et al., 2000). Gracias a la MS se han podido aislar nuevos ATIs en diversos cereales y cuantificarlos, aunque no haya un procedimiento único o estandarizado. De los resultados de esta revisión sería de especial interés proponer un estudio colaborativo con el objeto de alcanzar un consenso en los métodos de análisis, así de disponer de los patrones o materiales de referencia imprescindibles para validar cualquier método usado por los laboratorios.

Como se observa en las tablas 1, 2 y 3, la mayoría de los artículos revisados analizan solamente la fracción de las albúminas/globulinas cuando los ATIs se encuentran presentes en todas las fracciones. Esto podría llevar a una pérdida de información a la hora de obtener datos cuantitativos. El método de purificación y separación utilizado es la electroforesis en 1D o 2D combinada con LC, aunque en estudios comparativos en la 2D se observan variaciones de intensidad que impiden realizar medidas precisas de la concentración de los ATIs, pero no del resto de proteínas alérgicas del arroz. Esta inconsistencia se explica en la regeneración de los puentes disulfuro de los ATIs después de la 1D formándose macroagregados impidiendo que migren a su respectiva masa molecular en la 2D (Akagawa et al., 2007; Satoh et al., 2016).

La LC es una técnica que en combinación con la electroforesis se utiliza para la separación y purificación de los ATIs. Permite buenas separaciones en un amplio rango de pesos moleculares, polaridad y solubilidad, y se utiliza tanto de forma preparativa como en alta resolución previamente a su identificación por MS.

Se han encontrado pocos estudios específicos sobre la identificación de ATIs en alimentos procesados y menos de su bioactividad sobre el sistema inmunitario innato. La posible implicación de estas proteínas en la patogénesis de enfermedades gastrointestinales como la EC, la SGNC y otras enfermedades inflamatorias y autoinmunes, hacen necesario disponer de las mejores técnicas instrumentales para la detección y cuantificación de los ATIs, así como mecanismos para medir su actividad proinflamatoria tanto en cereales crudos como en los alimentos procesados.

### **CONCLUSIONES**

En la última década han mejorado las técnicas de análisis de los ATIS gracias a la optimización de los procedimientos de extracción y purificación, y al uso de técnicas MS que han permitido su identificación inequívoca y su cuantificación.

Se ha utilizado mayoritariamente dos estrategias para aislar nuevos ATIS en diversos cereales. En la primera, se separan las proteínas reactivas de la fracción extraída mediante inmunoensayos, normalmente con anticuerpos IgE, para posteriormente separarlas y digerirlas con tripsina e identificar los péptidos característicos mediante MS. En la segunda estrategia, una vez extraídas, purificadas y digeridas, los péptidos se detectan con MS y, dependiendo el objetivo del trabajo, se cuantifican.

La extracción de los ATIs está basada en la solubilidad secuencial de las proteínas en diferentes solventes utilizándose mayoritariamente la fracción de las albúminas/globulinas (85%) aunque también están presentes en las gliadinas y gluteninas. Para la purificación se utiliza la electroforesis (69%), en una o dos dimensiones (31%) previamente a su detección en el MS con fuente de ionización MALDI de forma mayoritaria (42%).

No se existe todavía una metodología normalizada para disponer valores cuantitativos fiables del contenido de ATIs en alimentos, valores fundamentales dado su potencial efecto adverso para la salud. Se deberían realizar estudios interlaboratorio que permitan llegar a un consenso en los métodos utilizados, así como disponer de patrones de ATIs en diversas matrices, imprescindibles para validar cualquier método analítico.

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores declaran ningún conflicto de interés. Los autores agradecen a la Universitat de València el apoyo científico y económico de su investigación

## **Bibliografía**

Akagawa M, Handoyo T, Ishii T, Kumazawa S, Morita N, Suyama K. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(17): 6863-6870.

Altenbach SB, Veshel WH, Dupont FM. The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Res Notes.* 2011; 4, 242.

Barrett ML, Udani JK. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr J.* 2011; 10, 24.

Bowman DE. Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1946; 63(3), 547-550.

Breiteneder H., Mills EN. Molecular properties of food allergens. *J. Allergy Clin Immunol.* 2005; 115(1), 14-23.

Carbonero Z, García P, Olmedo F. A multigene family of trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors from cereals. In: Sherry R, Casey R, editors. *Seed proteins*, Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999, p. 617-633.

Croote D, Quake SR. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. *NPJ Syst Biol Appl.* 2016; 2, 16022.

Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Ali I., Bonfili L., Cecarini V., Eleuteri A.M et al. Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding. *Food Chem.* 2016; 213, 571-578.

Dang L, Van Damme EJ. Toxic proteins in plants. *Phytochem.* 2015; 117, 51-64.

Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom.* 2009; 44(12), 1637-1660.

Flight I, Clifton P. Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr.* 2006; 60(10), 1145-1159.

Flodrová D, Benkovská D, Laštovičková M. Study of quantitative changes of cereal allergenic proteins after food processing. *J Sci Food Agric.* 2015; 95(5), 983-990.

Fontanini D, Capocchi A, Muccilli V, Saviozzi F, Cunsolo V, Saletti R. et al. Dimeric inhibitors of human salivary  $\alpha$ -amylase from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(25), 10452-10460.

Franco O, Rigden D, Melo F, Grossi-de-Sá M. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. *Eur J Biochem.* 2002; 269(2), 397-412.

Gadge PP, Wagh SK, Shaikh FK, Tak RD, Padul MV, Kachole MS. A bifunctional alpha-amylase/trypsin inhibitor from pigeonpea seeds: Purification, biochemical characterization and its bio-efficacy against *Helicoverpa armigera*. *Pestic Biochem Physiol.* 2015; 125, 17-25.

Gazza L, Gazzelloni G, Taddei F, Latini A, Muccilli V, Alfieri M. et al. The starch-bound alpha-amylase/trypsin-inhibitors in *Avena*. *Mol Genet Genomics.* 2016; 291(6), 2043-2054.

Goliáš J, Humlová Z, Halada P, Hábová V, Janatková I, Tučková L. Identification of rice proteins recognized by the IgE antibodies of patients with food allergies. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(37), 8851-8860.

Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008; 12(5), 483-490.

Heick J, Fischer M, Popping B. Influence of sample extraction solutions on the detection of wheat proteins by mass spectrometry. *J AOAC Int.* 2012; 95(2), 388-393.

Huebener S, Tanaka CK, Uhde M, Zone JJ, Vensel WH, Kasarda DD et al. Specific nongluten proteins of wheat are novel target antigens in celiac disease humoral response. *J Proteome Res.* 2015; 14(1), 503-11.

Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005; 4(9), 1265-72.

Islamov RA., Fursov OV. Bifunctional inhibitor of  $\alpha$ -amylase/trypsin from wheat grain. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2007; 43(4), 419-423.

Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch C, Rigden DJ, De Sá MFG. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32(11), 1195-1204.

Iulek J., Franco O.L., Silva M., Slivinski C.T., Bloch C., Rinden D.J. et al. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000; 1195–1204.

Izumi H, Sugiyama M, Matsuda T, Nakamura R. Structural characterization of the 16-kDa allergen, RA17, in rice seeds. Prediction of the secondary structure and



identification of intramolecular disulfide bridges. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999; 63(12), 2059-2063.

Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J. Exp.Med.* 2012; 209(3), 2095-2408. <https://doi.org/10.1084/jem.20102660>

Kearney J. Food consumption trends and drivers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2010;365(1554), 2793-2807.

Kitta K, Ohnishi-Kameyama M, Moriyama T, Ogawa T, Kawamoto S. Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal Biochem.* 2006; 351(2), 290-297.

Kneen E., Sandstedt RM. An amylase inhibitor from certain cereals. *J. Am. Chem. Soc.* 1943; 65, 1247-1252.

Kunitz M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science.* 1945; 101(2635), 668-669.

Laborde CM, Zubiri I, Alonso-Orgaz S, Mourino-Alvarez L, Álvarez-Llamas G, Barderas MG. The role of proteomics in the clinical laboratory. *Rev Lab Clin.* 2011; 4(4), 214-224.

Lang GH, Kagiya Y, Ohnishi-Kameyama M, Kitta K. Evaluation of extraction solutions for biochemical analyses of the proteins in rice grains. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013; 77(1), 126-131.

Li H., Han J., Pan J., Liu T., Parker CE., Borchers CH. Current Trends in Quantitative Proteomics - an update. *J Mass Spectrom.* 2017; 52(5), 319-341.

Mamone G, Nitride C, Picariello G, Addeo F, Ferranti P, Mackie A. Tracking the Fate of Pasta (*T. Durum Semolina*) Immunogenic Proteins by in Vitro Simulated Digestion. *J Agric Food Chem.* 2015;63(10), 2660-2667.

Mari A, Ciardiello MA, Tamburrini M, Rasi C, Palazzo P. Proteomic analysis in the identification of allergenic molecules. *Expert Rev Proteomics.* 2010; 7(5), 723-734.

Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Sherry PR. Structural, Biological, and Evolutionary Relationships of Plant Food Allergens Sensitizing via the Gastrointestinal Tract. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44(5), 379-407.

Monaci L, Visconti A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends Analyt Chem.* 2009; 28(5), 581-591.

Monaci L, Visconti A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends Analyt Chem.* 2009; 28(5), 581-591.

Ong S, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol.* 2005; 1(5), 252-62.

Pastorello EA, Farioli L, Conti A, Pravettoni V, Bonomi S, Iametti S, et al. Wheat IgE-mediated food allergy in European patients: alpha-amylase inhibitors, lipid transfer proteins and low-molecular-weight glutenins. Allergenic molecules recognized by double-blind, placebo-controlled food challenge. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 144(1), 10.

Payan F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1696(2), 171-80.

Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM. et al. UPLC/MS<sup>E</sup>; a new approach for generating molecular fragment information for

biomarker structure elucidation. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20(13), 1989-1994.

Prandi B, Faccini A, Tedeschi T, Galaverna G, Sforza S. LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. *Food Chem.* 2013; 140(1), 141-146.

Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. Non-Celiac Gluten Sensitivity: Nutritional management of the disease. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.* 2017; 37(1), 179-190.

Reig-Otero Y, Manyes L, Mañes J. Amylase-trypsin Inhibitors in wheat and other cereals as potential activators of the effects of non-celiac gluten sensitivity (NCGS). *J. Med. Food.* 2017; 21(3), 207-214.

Robison RG, Pongracic JA. Food allergy. *Allergy Asthma Proc.* 2012; 33(3), 77-79.

Salcedo G, Quince S, Diaz-Perales A. Wheat Allergens Associated With Baker's Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2011; 21(2), 81-92.

Sancho AI, Mills EN. Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterisation of food allergens. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010; 58(3), 42-46.

Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K. et al. Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016; 80(11), 2198-2207.

Sen S, Dutta SK. A potent bidirectional promoter from the monocot cereal *Eleusine coracana*. *Phytochemistry.* 2016; 129, 24-35.

Sherry R, Casey R. Seed proteins. Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999.

Silano V, Pocchiari F, Kasarda DD. Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. *Biochim Biophys Acta.* 1973; 317(1), 139-48.

Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cinová J, Šetinová I, Kainarová A et al. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41(7), 1031-1043.

Uvackova L, Skultety L, Bekesova S, McClain S, Hajduch M. MS<sup>F</sup> based multiplex protein analysis quantified important allergenic proteins and detected relevant peptides carrying known epitopes in wheat grain extracts. *J Proteome Res.* 2013; 12(11), 4862-4869.

Vasil IK. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.* 2007; 26(8), 1133-54.

Villalta D, Longo G, Mistrello G, Amato S, Asero R. A case of rice allergy in a patient with baker's asthma. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2012; 44(5), 207-9.

Wang P, Giese RW. Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2017; 1486, 35-41.

Zevallos V, Herencia I, Schuppan D. Tu1381 Gluten-Free Crops Can Contain Proteins With Innate Immune Stimulatory Capacity: Influence of Environmental Factors. *Gastroenterology.* 2016; 150(4), S890.

Zevallos V., Raker V., Tenzer S, Jiménez-Clavente C., AShfaq-Khan M., Rüssel N. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology.* 2017; 152(5), 1100-1113.e12

**Tabla 1.** Métodos extracción, purificación e identificación de ATIs en distintas variedades de trigo

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Trigo <i>Triticum aestivum</i>	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 50 mM pH 7.8 y precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	FPLC	nUPLC-IMS-QTOF-MS	0,28; 0,53; 0,19; CM16; CM17; CM1; CM2; CM3; CMX1 y CMX30. 19 y 0.53 representa >50% de los ATIs	(Zevallos et al., 2017)
Mezcla 50% trigo <i>Triticum durum</i> y 50% trigo <i>Triticum aestivum</i> Muestra cruda y muestra cocida	<i>albuminas/globulinas:</i> 0.5 M NaCl, pH 8.5 en 0.05 M Tris-HCl <i>Gliadinas:</i> 70% (v/v) etanol <i>Gluteninas:</i> 2.5 ml of Tris-SO <sub>4</sub> , pH 6.1, 10% (p/v) SDS, 2-mercaptoetanol y 50% (v/v) glicerol.	SDS-PAGE	MALDI-TOF ESI-MS/MS	<i>Albuminas/Globulinas:</i> CM1, 0.19, CM3, CM6 <i>Gliadinas:</i> CM2, CM16, 0,19 <i>Gluteninas:</i> CM2, CM3, CM16	(Pastorello et al., 2007)

**Tabla 1.** Continuación

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Trigo <i>Triticum aestivum</i> cultivars Norin No. 61, Kitanokaori y Haruyokoi,	<p><i>Proteínas totales:</i> 8M urea, 40 mM Tris, and 4% CHAPS</p> <p><i>Albuminas/Globulinas:</i> 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8)</p> <p><i>Gliadinas:</i> 75% etanol</p> <p><i>Gluteninas:</i> 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1% SDS y 0.5% DTT</p>	IEF X LDS-PAGE	MALTI TOF/TOF	0.28, WDAI	(Akagawa <i>et al.</i> , 2007)
Trigo <i>Triticum aestivum</i>	PBS – Tampón fosfato sódico	Ultrafiltración consecutiva (100k, 30k y 10k) IEF + RP-HPLC SDS-PAGE	MALDI MS/MS	0.19, 0.28, 0.53 CM17, CM1, CM2, CM16, CM3 CMX1/CMX3, IAAS	(Šotkovský <i>et al.</i> , 2011)

**Tabla 1.** Continuación

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Trigo <i>Triticum turgidum</i> spp. <i>durum</i>	Solución 0.5 M NaCl	SDS–PAGE	HPLC-LTQORBITRAP HPLC/ESI-MS/MS UPCL/ESI-MS	CM3	(Flodrová <i>et al.</i> , 2015)
Trigo Emmer o farro <i>Triticum dicoccon</i> Schrank	Solución: 0.15 M NaCl y precipitado con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	RP-HPLC SDS-PAGE	MALDI-TOF RP-HPCL/nESI-MS/MS	EDI-1, EDI-2	(Fontanini <i>et al.</i> , 2007)
Trigo <i>Triticum aestivum</i> cultivar Viginta	<i>Gliadinas:</i> 1 mL de 50% (v/v) isopropanol <i>Gluteninas:</i> 1 mL de 50% (v/v) isopropanol, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) conteniendo 1% (p/v) DTT		UPLC-QTOF-MS <sup>E</sup>	<i>Gliadinas:</i> CM16 (1.5 ng/μg) CM2 (3.4 ng/μg) <i>Gluteninas:</i> CM17 (6.8 ng/μg), CM1 (1.5 ng/μg), CM16 (1.7 ng/μg)	(Uvackova <i>et al.</i> , 2013)
Harina de trigo <i>Triticum aestivum</i> cultivar Hokushin	8 M urea, 2% (v/v) Triton X-100, 0,001% Bromofenol azul (BPB)	IPG X AU-PAGE	MALDI-TOF		(Kitta <i>et al.</i> , 2006)

**Tabla 1.** Continuación

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Trigo <i>Triticum turgidum</i> L. subsp. durum	Isopropanol (1:5 p/v)	IMAC (Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados)	HPLC	CM3	(Cuccioloni <i>et al.</i> , 2016)
Muestra de pasta comercial de trigo <i>Triticum durum</i> Muestra cruda y muestra cocida	<i>Proteínas totales:</i> 7 M urea, 80 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 <i>albuminas/globulinas:</i> 0.4 M NaCl, 0.067 M H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> , pH 4.6.	SDS-PAGE	LC-ESI MS/MS	CM3, CM16, CM2	(Mamone <i>et al.</i> , 2015)
Trigo <i>Triticum aestivum</i> L., cultivar Saratovskaya	Solución acetato 0.1 M y precipitado con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cromatografía de afinidad con tripsina– Sepharosa SDS-PAGE		Se identifica un inhibidor bifuncional de 14kDa	(Islamov y Fursov, 2007)



**Tabla 2.** Métodos de extracción, purificación e identificación de ATIs en distintas variedades de arroz.

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> cv.)	<p><i>Proteínas solubles en sales:</i> 30mM Tris-HCl pH 8.0/pH 6.8 y 1M NaCl</p> <p><i>Insolubles:</i> 55-mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol y 11 mg/mL de DTT</p> <p><i>Proteínas totales:</i> 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 2% (p/v) SDS, 0.6% (v/v) 2-mercaptoetanol y 4M urea; 50mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% (p/v) SDS, 20% (p/v) glicerol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 8 M urea</p>	SDS-PAGE	MALDI-TOF	No se detallan en la publicación	(Lang <i>et al.</i> , 2013)
Arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. var. <i>japponica</i> cv <i>Nipponbare</i> )	Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	IC - HPLC	JOEL JLC-300	RA17	(Izumi <i>et al.</i> , 1999)

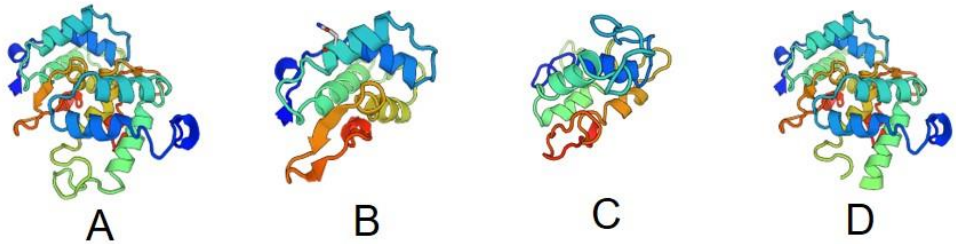
**Tabla 2.** Continuación

Tipo de muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Arroz crudo y cocido ( <i>Oryza sativa</i> L.)	Dos soluciones: PBS – Tampón fosfato sódico: 0.9% NaCl, 0.02% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y 0.05% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.2  SDS – Tampón dodecilsulfato sódico: 1% SDS, 10% glicerina, 5% 2-mercaptoetanol, y TRIS 50 mM	SDS-PAGE	MALDI-TOF/TOF - LIFT	RA5, RAG2, RAG1	(Goliáš <i>et al.</i> , 2013)
Arroz, dos variedades japonesas ( <i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare y Koshihikari), un arroz indio (Kasalath), y un arroz tailandés (Bleiyo)	<i>Soluciones salinas:</i> solución I, 1M NaCl; solución II, 0.5M NaCl en 30mM Tris-HCl (pH 6.8) <i>Kit comercial</i> P-PER (Thermo Fisher Scientific,) <i>Solución de urea:</i> 8 M Urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT	SDS-PAGE 2D-DIGE		RAG1, RAG2, RAG3, RAG4 y RAG5	(Satoh <i>et al.</i> , 2016)

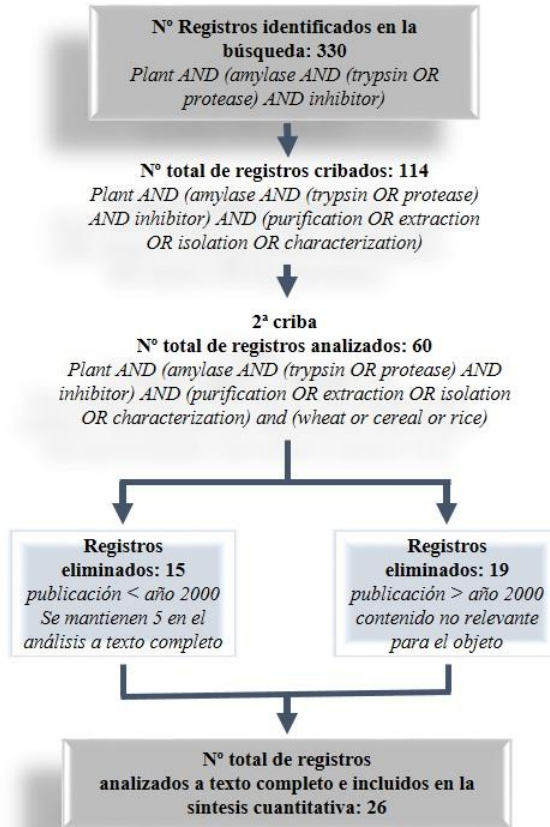
**Tabla 3.** Métodos extracción, purificación e identificación de ATIs en otros cereales

Muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Avena ( <i>Avena sativa</i> )	50 mM NaCl y 50 % (v/v) propan-2-ol.	A-PAGE × SDS-PAGE	RP-HPLC/n-ESI-MS/MS	AATI-1, AATI-2, AATI-3	(Gazza <i>et al.</i> , 2016)
Centeno ( <i>Secale cereale</i> ).	70% solución etanol (v/v) y precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1. Diálisis 2. CII – DEAE 3. Las fracciones con actividad inhibitoria se purifican con CII – CM 4. SDS-PAGE	MALDI-TOF	Inhibidor homólogo en un 80% BTAI y 60% WTAI	(Iulek <i>et al.</i> , 2000)
Pigeonpea ( <i>Cajanus cajan</i> L.)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM pH 6.9	N-LP-IEF SDS-PAGE	MALDI -TOF	CcdAI	(Gadge <i>et al.</i> , 2015)
Ragi ( <i>Eleusine coracana</i> Gaertn.)	0.15 M NaCl	Columna Trypsin-Sepharosa FPLC	MALDI-TOF-TOF-MS/MS	PKI RBI PKII	(Sen y Dutta, 2016)

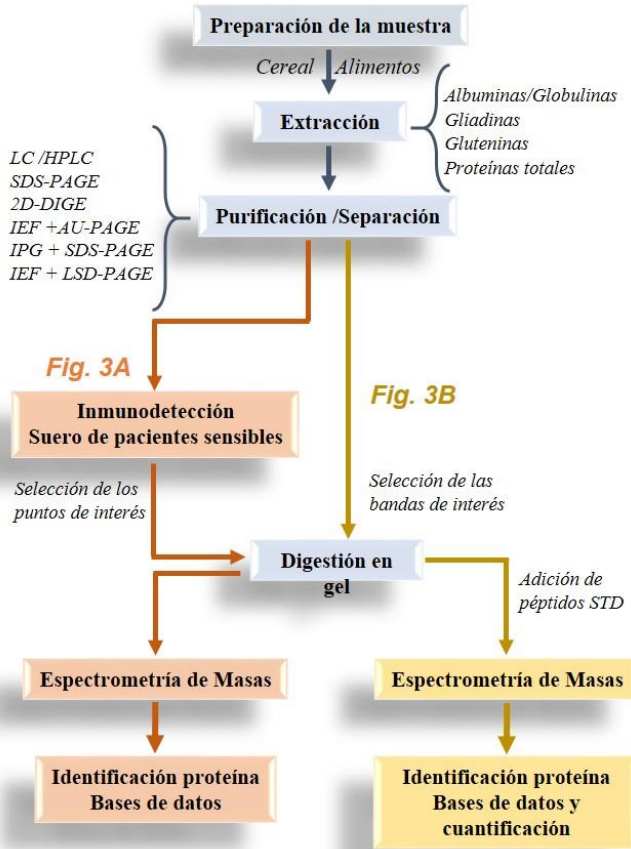
**FIGURAS**



**Figura 1.** Representación de las estructuras 3D de varios inhibidores de la familia de los cereales: Inhibidor de la amilasa y la tripsina del trigo A) 0.53 B) 0.28 C) CM3 D) 0.19. Fuente: Swiss-Model Repository <https://swissmodel.expasy.org/repository>.



**Figura 2.** Diagrama de flujo y criterios de búsqueda utilizados para la revisión sistemática



**Figura 3.** Estrategias de análisis utilizadas para la identificación y cuantificación de los ATIs en cereales

# Discusión general







## 4. Discusión general

---

La respuesta inmunitaria frente a los alimentos que contienen gluten se desencadena tras el reconocimiento de determinados antígenos por receptores celulares situados en SGI como son los TLRs. En la EC, los estudios que han analizado la expresión de los TLRs no describen claramente el inicio de la activación de la inmunidad innata, prerequisite para que el mecanismo adaptativo evolucione a la una enfermedad autoinmune. Existe otra vía, por la que la fracción de las gliadinas del gluten, concretamente la  $\alpha$ -gliadina y la  $\gamma$ -gliadina, activan la inmunidad adaptativa en esta patología (Castillo *et al.*, 2015; Fasano *et al.* 2011; Thomas *et al.* 2006). Como se indica en el primer artículo publicado, en la SGNC existe una vinculación del sistema inmunitario innato y la expresión de los TLRs con el consumo de alimentos que contienen gluten, aunque no está claro si esta proteína es la responsable de los síntomas en esta patología (Reig-Otero *et al.* 2017a; Sapone *et al.* 2011). Los estudios revisados en los que se ha utilizado PT-Gliadina, en donde se separa la gliadina de los posibles efectos de otras proteínas contenidas en las muestras, no se ha encontrado una clara relación con los síntomas (Junker *et al.*, 2012; Kaliszewska *et al.*, 2016). Varios trabajos recientes, además, indican que en la SGNC puede también haber una pequeña componente adaptativa (Brottweit *et al.*, 2013; Puccetti *et al.*, 2018).

En este sentido, para determinar cómo se expresan los TLRs en la EC y en la SGNC, se hizo una revisión de los estudios clínicos que analizan esta expresión en biopsias y muestras de sangre de pacientes con EC y SGNC en diferentes estados, tratados con DSG, sin tratar y grupos de control (Reig-Otero *et al.* 2017b). Se observó la expresión de los TLRs es dispar, hay estudios que no han encontrado diferencias

frente al control, otros donde se observan valores más elevados con EC en remisión y activa frente al control, como otro que solamente se expresan en enfermos con SGNC siendo no significativa en la EC (Brynychova *et al.*, 2016; Cseh *et al.*, 2011; Kalliömaki *et al.*, 2012; Losurdo *et al.*, 2016; Marafini *et al.*, 2015; Sapone *et al.*, 2011; Szebeni *et al.*, 2007). Asimismo, empleando modelos murinos, vemos que no hay expresión significativa de los TLRs frente a los controles al utilizar como muestra la PT-Gliadina (tabla 12).

**Tabla 13.** Relación de la expresión de los TLRs y la inmunidad innata en EC y SGNC en modelos murinos (MM); GC: Gliadina comercial; PT-G: Gliadina digerida con pepsina y tripsina; GEATIs: Gliadina enriquecida con ATIs.

Objetivos del estudio	Muestra	Resultados en relación con los TLR	Referencia
Definir la componente de inmunidad innata en la enfermedad celiaca	Cultivo de macrófagos, monocitos y células dendríticas y biopsias duodenales de roedores inducidos con PT-gliadina y ATIs del trigo	No hay expresión significativa del TLR4 en MM alimentados con PT-G  TLR4 MM GEATIs >> MM PT-G	Junker <i>et al.</i> , 2012
Comparar la respuesta inmune innata y adaptativa utilizando un extracto de gliadina comercial y gliadina enriquecida con ATIs	Biopsias duodenales de roedores alimentados con extractos de gliadinas comerciales y gliadinas enriquecidas con ATIs	TLR4 MM GEATIs >> MM GC > control	Kaliszewska <i>et al.</i> , 2016

En estos estudios, en donde se puede separar el efecto de la gliadina del resto de componentes de la alimentación, sí que existe una activación clara de los TLR4 cuando las gliadinas se enriquecen con las fracciones no-gluten del trigo, como son los ATIs (Junker *et al.*, 2012; Kaliszewska *et al.*, 2016).

## 4.1 ATIs

Los ATIs son proteínas que se han vinculado con en la activación del sistema inmune innato como se ha demostrado en diversos trabajos (Cucciolini *et al.*, 2016; Junker *et al.*, 2012; Kaliszewska *et al.*, 2016; Reig-Otero *et al.*, 2017b; Sánchez *et al.*, 2018; Schuppan *et al.*, 2015; Tilg *et al.*, 2013; Zevallos *et al.*, 2017; Zevallos *et al.*, 2018). Aunque no se descarta que pueda haber otras vías de señalización dependientes de la gliadina, se ha demostrado que los ATIs son unos fuertes activadores de la respuesta del sistema inmune innato provocando un aumento de la expresión de los TLR4 en el intestino. Se observó que la actividad proinflamatoria de las citoquinas no se presentaba con las fracciones de  $\alpha$  y  $\gamma$ -gliadinas, que constituyen el 90% del total de las gliadinas, pero sí con fracciones de las  $\omega$ -gliadinas en las que se identificó los péptidos característicos de los ATIs tetramérico CM3 y dimérico 0.19 como potentes activadores del complejo TLR4-MD2-CD14 produciendo importantes efectos sobre el sistema inmunitario innato tanto *in vivo* como *in vitro* (Junker *et al.*, 2012).

Estos resultados ponen en evidencia el rol de la gliadina del gluten en la activación del sistema inmune innato en la SGNC y en la EC, además son importantes para conocer el mecanismo de activación del sistema inmune innato en estas enfermedades y, posiblemente para otras patologías gastrointestinales. Además, indican que los ATIs han podido ser un contaminante en el gluten y en las diversas fracciones de las gliadinas preparadas como reactivo en los ensayos.

Kaliszewska *et al.* (2016) confirman esta hipótesis ya que analizan la activación del sistema inmune innato y adaptativo de modelos murinos alimentados con una gliadina comercial y el extracto soluble de esta gliadina, mayoritariamente ATIs, en soluciones salinas. Ambas fracciones fueron digeridas mediante un

simulador de la digestión gastrointestinal humana previamente antes de utilizarlas en los ensayos. Los análisis de estas fracciones revelan que las gliadinas comerciales contienen los ATIs CM3 y 0.19 en un porcentaje entre el 2,8 y el 4,0% del total de proteína, y que el extracto soluble de las mismas contiene sobre un 19,9% de estos ATIs. Los resultados muestran que las biopsias de los ratones alimentados con la fracción soluble de las gliadinas tuvieron una mayor concentración de los TLR4 y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), citoquina que activa la función de los macrófagos en la inmunidad adaptativa, que los ratones alimentados con las gliadinas comerciales. Las biopsias de los ratones alimentados con las gliadinas comerciales mostraron expresiones más elevadas de otros marcadores vinculados con la activación del sistema inmune como son las células CD3+, CD4+ y Foxp3+. Según los autores, los datos indican que el potencial citotóxico e inmunogénico de las proteínas de la fracción soluble en soluciones salinas, mayoritariamente ATIs, es significativamente diferente cuando se administra independientemente a las gliadinas a las que están asociadas en las muestras comerciales. Por tanto, las respuestas proinflamatorias se entremezclan cuando están asociadas a las gliadinas. Zevallos *et al.* (2016) también comprueban que el gluten comercial contiene ATIs hasta un 5% en peso y es capaz de activar las células dendríticas de forma dependiente a su contenido, mientras que este mismo gluten digerido con pepsina y tripsina, no es capaz de activarlas.

Otro aspecto a considerar, además de que las muestras comerciales de gluten contienen cantidades significativas de estos inhibidores, es que los ATIs son difíciles de separar de otras fracciones de proteínas del trigo. Se han podido identificar en las diferentes fracciones obtenidas por extracción selectiva del trigo con cloroformo/metanol, también en soluciones acuosas, soluciones salinas y en mezclas de alcohol/agua (tabla 13) (Pastorello *et al.*, 2007).

**Tabla 14.** Alérgenos identificados en las tres fracciones del trigo (Pastorello *et al.*, 2007).

Fracción del trigo	Tipo de alérgeno	ATI identificado
<b>Albuminas/globulinas</b>	LPT	
	Inhibidor Alpha- amilasa/tripsina	CM1, CM3; 0.19, CM16
	Globulinas	
	Peroxidasa 1	
	Serpina	
<b>Gliadinas</b>	Inhibidor Alpha- amilasa/tripsina	CM2, CM16
	$\gamma$ -gliadina, $\alpha$ -gliadina	
	Gluteninas LMW	
<b>Gluteninas</b>	Inhibidor Alpha- amilasa/tripsina	CM2, CM3, CM16
	Puroindolina-a	
	Puroindolina-b	
	Tritin ( <i>Triticum aestivum</i> )	
	Gluteninas LMW	
	Almidón	
	$\beta$ -amilasa	

Cuando analizamos los ensayos DCACP realizados con pacientes con SGNC, ninguno considera los ATIs como parte activa a analizar, sino que utilizan mayoritariamente harinas que contienen gluten, concretamente trigo, adicionadas a diversos alimentos (Biesiekierski *et al.*, 2011; Biesiekierski *et al.*, 2013; Carroccio *et al.*, 2012; Cooper *et al.*, 1980; Dale *et al.*, 2018; Di Sabatino *et al.*, 2015; Elli *et al.*, 2016; Francavilla *et al.*, 2018; Peters *et al.*, 2014; Shahbazkhani *et al.*, 2015; Zanini *et al.*, 2015; Zanwar *et al.*, 2016). En todos ellos hay un empeoramiento significativo de los síntomas gastrointestinales en las semanas que se consume el medio que

contiene gluten. Es posible que en los resultados obtenidos se entremezclen los efectos del gluten con los de otras proteínas como los ATIS.

Un grupo de investigación de la Universidad de Mainz, Alemania, aportaron un bioensayo celular con el que cuantificaron la capacidad de los ATIs contenidos en diversos alimentos, para activar el sistema inmune innato mediante la medida de la concentración de las interleucinas IL-8 y otras citoquinas, en cultivos celulares humanos (THP-1). Analizaron la bioactividad de los ATIs presentes en cereales, legumbres y granos crudos (como el arroz, trigo, cebada, centeno, quinoa, lentejas, kamut, etc.) y en alimentos procesados (como el pan, pasta, pizza, etc.). Concluyeron que los ATIs del trigo, la cebada y el centeno, cereales que contienen gluten, son los que mayor bioactividad tienen en la liberación de citoquinas, siendo hasta 100 veces mayor que otros cereales o alimentos que no contienen gluten. Dentro de las variedades del trigo, las variedades más antiguas como la espelta o el kamut, tienen una actividad menor que el trigo actual. La bioactividad de los alimentos sin gluten fue baja y podría subdividirse en aquellos con menos del 20% (soja, alforfón, mijo y teff), menos del 10% (lentejas, quinoa y avena) y menos del 2% (amaranto, arroz, maíz y patatas) de la actividad de una harina de trigo común, medida por gramo de harina extraída (Zevallos *et al.*, 2017).

En la tabla 15 se especifican los alimentos crudos ensayados, el grado de bioactividad obtenida comparado con la respuesta del trigo común y la estructura de los ATIs. Las diferencias de reactividad encontradas entre cereales con gluten y sin gluten podrían estar vinculadas con la estructura de los ATIs. La estructura secundaria y terciaria de los ATIS en alimentos sin gluten poseen de uno a tres puentes de disulfuro en vez de cinco como tiene el trigo (la cebada o el centeno), además de diferente disposición de las hélices  $\alpha$ .

**Tabla 15.** Grado de bioactividad de cereales y legumbres y estructura de los ATIs (Zeballos *et al.*, 2017).

Cereal/Legumbre	Bioactividad inmune innata	Estructura de los ATIs
Trigo ( <i>Triticum ssp. aestivum</i> )	Alta (100%)	Tipo Cereal/Kunitz
Centeno	Alta	Tipo Cereal/Kunitz
Cebada	Alta	Tipo Cereal/Kunitz
Soja	Media (<20%)	Tipo Lectina
Trigo Sarraceno / Alforfón	Media	Desconocido
Mijo	Media	Tipo Kunitz
Teff	Media	Desconocido
Lentejas	Baja (<10%)	Tipo lectina
Quinoa	Baja	Desconocido
Avena	Baja	Desconocido
Amaranto	Muy baja (<2%)	Tipo Knottin
Arroz	Muy baja	Tipo Kunitz
Maíz	Muy baja	Tipo Taumatin

## 4.2 FODMAPS

Los síntomas provocados por los FODMAPS podrían sumarse ya que el trigo contiene elevadas cantidades de oligosacáridos. Estas interferencias se observan en dos estudios DCACP realizados por el mismo grupo de investigación que promueve la dieta baja en FODMAPS (Biesiekierski *et al*, 2011; 2013). En el primero, se relacionaron los síntomas gastrointestinales que presentaban los pacientes con la ingestión de gluten y en el segundo, no se encontró relación de los síntomas con el gluten. Los investigadores achacan estas diferencias a que el gluten utilizado en ambos estudios podía ser diferente ya que los proveedores eran diferentes. Indican que, aunque el contenido de gluten era similar, las proteínas diferentes a la fracción del gluten de las muestras no fueron caracterizadas, por lo que en el primer estudio podrían estar involucradas otras proteínas como los ATIs, u otros componentes del trigo como los FODMAPS.

Estas conclusiones se repiten en más trabajos, por ejemplo, dos estudios realizados en 2015 y 2016, se administran cápsulas de gluten, y en ambos se encontró un empeoramiento de los síntomas con el gluten utilizado. El primero utiliza “gluten de trigo purificado” del que no se especifica el método de purificación, el % de pureza, ni se analiza la composición de las proteínas contenidas, mientras que en el segundo sí que analizan las proteínas contenidas en el gluten de trigo encontrándose una proteína de peso molecular inferior a 17 kDa, identificada como proteína de la familia de los ATIs (Di Sabatino *et al.*, 2015; Elli *et al.*, 2016). Dale *et al.*, (2018) realizaron un ensayo DCACP utilizando muffins a los que se les añadió “gluten aislado 100% puro” extraído de la harina de trigo. Los ingredientes utilizados eran todos bajos en FODMAPS (azúcar, almidón de trigo libre de gluten, cacao



desgrasado, harina de arroz, huevo, fécula de patata, gasificante, aceite de colza, sal y vainillina). No se observó efecto del gluten, la mayoría de los pacientes con sospecha de SGNC no fueron capaces de identificar los muffins que contenían gluten del placebo. Los autores indican que, aunque el DCACP es el método de referencia los pacientes no diferenciaron la muestra con gluten del placebo, y según indican, una debilidad del estudio fue la falta de control de otros factores dietéticos como el contenido total de FODMAPs y ATIs en la dieta de los participantes.

La sospecha de que los efectos adversos de individuos con SGNC al ingerir alimentos que contienen gluten se debiera al propio gluten es por lo menos cuestionable. Es más, se reconoce en la “3rd Internacional Expert Meeting in Gluten Related Disorders” que no está desarrollado todavía un vehículo adecuado para realizar la introducción del gluten en los ensayos clínicos para evitar la posible superposición de los FODMAPs, el gluten y la actividad proinflamatoria de los ATIs.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos todo indica (1) que en la SGNC los TLRs están vinculados en la iniciación de inmunidad innata, y que la activación del sistema inmune ocurre de forma diferente que la EC, (2) que existe algún otro componente del trigo distinto al gluten que incrementa la expresión de los TLRs, y (3) que este componente está actuando como “contaminante” e interfiriendo en los diversos trabajos realizados para estudiar la capacidad del gluten de activar el sistema inmunitario en la EC y la SGNC.

### 4.3 Alimentos procesados

Otro aspecto a considerar es que el procesado de los alimentos somete a las proteínas de los productos de partida a condiciones de temperatura, humedad, presión, etc., que provoca modificaciones en su estructura impactando de forma crítica en la digestibilidad y en la actividad inflamatoria del alimento final (Sathe et

*al.*, 2009; Verhoeckx *et al.*, 2015; Wal, 2003). Esta transformación puede afectar a su potencial proinflamatorio disminuyéndolo y en algunos casos aumentándolo (Verhoeckx *et al.*, 2015). En este sentido, se ha demostrado que la actividad proinflamatoria los ATIs contenidos en alimentos procesados, disminuye frente al cereal en crudo, aunque sería oportuno conocer si los ATIs son lo suficientemente activos para impactar en la SGNC o en otras patologías del SGI, qué tipo de ATIs y estructuras son las más activas y en qué cantidades pueden afectar a estos pacientes. Asimismo, disponer de una clasificación de los alimentos según su actividad proinflamatoria, de la misma manera que se ha realizado con los FODMAPS, ayudaría a diseñar pautas dietéticas para los pacientes con SGNC.

En la literatura científica diversos trabajos identifican la capacidad reactiva de las proteínas de alimentos a base de trigo en función del procesado aplicado, aunque muy pocos de ellos se han centrado en analizar exclusivamente la actividad de los ATIs (De Zorzi *et al.*, 2007; Mamone *et al.*, 2015; Pastorello *et al.*, 2007; Scibilia *et al.*, 2005; Simonato *et al.*, 2001; Simonato *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2010). Para identificar la reactividad de las distintas proteínas se ha utilizado anticuerpos IgE específicos poniendo en contacto los alimentos con el suero de pacientes alérgicos al trigo, mediante inmunotransferencia o electrotransferencia con membranas de nitrocelulosa (Western Blot), en otros casos también se ha estudiado la respuesta frente a anticuerpos IgA e IgG, característicos de la EC.

Dado que en la SGNC no hay una respuesta alérgica, no sería correcto considerar los IgE como anticuerpos característicos de la patología, tampoco los IgA e IgG ya que como se ha descrito, no son propios de la SGNC (Carroccio *et al.*, 2012; Sapone *et al.*, 2011; Volta *et al.*, 2012, 2014, 2016). Podría utilizarse los IgM considerando los resultados del estudio de Uhde *et al.* (2016), aunque hoy en día, no

existe consenso de qué indicador es el adecuado para identificar una alteración vinculada con la SGNC. En este sentido, otros trabajos, en vez de valorar la reactividad de las proteínas usando anticuerpos específicos, se han basado en la capacidad que tienen estos alimentos para generar determinadas citoquinas características de la inmunidad innata o para alterar la expresión de los TLRs sobre modelos murinos o cultivos celulares (Zevallos *et al.*, 2012, 2016a, 2016b, 2016c, 2017).

No se han encontrado, en el momento de la redacción de este trabajo, estudios de intervención en el que se analice el comportamiento del sistema inmune en pacientes con SGNC, con el consumo de alimentos procesados con un contenido en ATIs controlado. Todos los estudios analizados han realizado la investigación sobre modelos murinos o en cultivos celulares que, aunque demuestran una vinculación significativa entre alimentos con contenido en ATIs y la activación del sistema inmune innato, sería necesario estudios sobre humanos que lo evidencien. En la actualidad hay en marcha un ensayo clínico con el objetivo de analizar la palatabilidad y la tolerancia de diferentes composiciones de pan, uno de ellos bajo en ATIs, en individuos identificados con SGNC (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02308397). Según los registros consultados, los primeros resultados se han obtenido en marzo de 2018, aunque no existe ninguna publicación de estos.

Está demostrado que los ATIs contenidos en los alimentos procesados, tienen una bioactividad inferior en comparación con harinas no procesadas (Boukid *et al.*, 2017; De Zorzi *et al.*, 2007; Mamone *et al.*, 2015; Pastorello *et al.*, 2007; Scibilia *et al.*, 2005; Simonato *et al.*, 2001; Simonato *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2010; Zevallos *et al.*, 2017). Esto podría ser debido a que hay un cambio de la estructura de los ATIs con la temperatura, cambios que se observan también cuando las masas

de pan se someten a un tratamiento de fermentación larga (Boukid *et al.*, 2017; Laatikainen *et al.*, 2017; Zevallos *et al.* 2017). Con estos tratamientos se produce una ruptura de los puentes de disulfuro en la estructura de los ATIs, pasando de un estado agregado, o tetraméricos, a monoméricos disminuyendo su potencial proinflamatorio. En el estudio de Zevallos *et al.* (2017) el pan, la pizza, las galletas y el cuscús tenían una bioactividad menor, del 30 al 50%, en comparación con la harina de trigo cruda. Asimismo, cuando se hierve la pasta con sal, observan que la pasta muestra una bioactividad significativamente disminuida (alrededor del 70%) frente a su cocción simplemente con agua, resultados que están en consonancia con los obtenidos por Mamone *et al.* (2015). Estos autores, comparan la digestibilidad y el potencial inmunológico de las proteínas de pasta cruda de trigo duro y la pasta una vez procesada. Se observó que, así como los LPS son resistentes tanto a la acción de las proteasas como a la cocción, los ATIs, aun siendo resistentes a la hidrólisis en crudo, se recuperan completamente en el agua de la cocción a la que se le ha añadido 3,5g de sal. Podíamos decir que hay una extracción muy eficiente de los ATIs en el agua de cocción.

### 4.4 La respuesta inmunitaria en la SGNC

Independientemente de la determinación del grado proinflamatorio de los alimentos que contienen ATIs, es esencial conocer porqué se inicia la sensibilidad a alimentos que contienen trigo (gluten/ATIs) cuando no se tiene una patología de base vinculada con la EC o con alergia al trigo/gluten. En este sentido, el factor previo para que haya una traslocación de antígenos al lumen intestinal y que tenga lugar toda la cadena de señales vinculadas con la activación del sistema inmune innato, pasa por tener la pérdida de integridad de la barrera intestinal. En la SGNC se ha confirmado que existe una permeabilidad intestinal incrementada similar a la que

tienen los pacientes con EC (Biesikierski *et al.*, 2011; Hollon *et al.*, 2015; Uhde *et al.*, 2016). Los factores a los que se les atribuye esta alteración, cabría citar (1) infecciones previas de parásitos, bacterias o virus, (2) un desequilibrio de la flora intestinal o disbiosis, (3) un sistema inmunitario debilitado por enfermedades inflamatorias preexistentes o la existencia de enfermedades autoinmunes, (4) un deficitario desarrollo del sistema inmunitario durante la infancia, o (5) la existencia de un componente genético como ocurre en la EC (Pickert *et al.*, 2016; Vatanen *et al.*, 2016; Zevallos *et al.*, 2016a, 2018).

Los biomarcadores identificados para diferenciar la SGNC de la EC más recientes, sugieren que existe una barrera epitelial dañada debido a una inadecuada regulación de la microbiota intestinal (Uhde *et al.* 2016). Estos autores, observaron que los individuos con SGNC presentaban una reactividad clara a los LPS bacterianos y a la flagelina, marcadores se normalizan después de una DSG. Parece ser que la vía de activación de los TLR4 por los ATIS es similar a la inducida por los LPS (Junker *et al.*, 2012; Leccioli *et al.*, 2017; Zevallos *et al.*, 2017). Concentraciones elevadas de LPS pueden presentarse durante situaciones de estrés, con el consumo de medicamentos como antibióticos y antiinflamatorios (AINES), incluso durante una infección alimentaria (Guo *et al.*, 2013). Contrariamente a los ATIS, los LPS son normalmente inactivados por los ácidos gástricos y por una enzima, la fosfatasa alcalina intestinal (FAI). La FAI es una enzima capaz de desfosforizar la porción lipídica de los LPS, eliminando su capacidad de activar los TLR4 (Bol-Schoenmarkers *et al.* 2010; Melo *et al.*, 2016). Se expresa en todo el tracto intestinal con la máxima expresión en el duodeno, y en menor medida en el yeyuno, íleon y colon (Bilski *et al.*, 2017; Fawley y Gourlay, 2016). En este sentido, se ha observado que niveles por debajo de lo normal están relacionados con diversas patologías del sistema digestivo como el SII, la EII, la EC, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Lallés 2010;

Molnár *et al.*, 2012). Por otro lado, no sería descartable el posible rol genético en las enfermedades inflamatorias del SGI. Un estudio de 2018 indica la existencia de una mutación en la FAI que hace perder su función de detoxificación de los LPS predisponiendo al individuo a respuestas inflamatorias en el intestino (Parlato *et al.*, 2018).

Inciendiando en los factores predisponentes de la SGNC, se ha relacionado una composición alterada de la microbiota con varias enfermedades gastrointestinales como la EC, SII, dispepsia funcional, diarrea asociada a antibióticos, enteropatía tropical y otras (Forbes *et al.*, 2016; Levy *et al.*, 2017). Dado que la SGNC es una patología relativamente reciente, solo se ha encontrado un estudio que analiza la microbiota de individuos con SGNC. En este trabajo, realizado por Dieterich *et al.* (2018) se compara la composición de la microbiota, en individuos con SGNC e individuos sanos siguiendo una dieta baja en FODMAPs o siguiendo DSG, y la relaciona con la activación del sistema inmune y diversos indicadores relevantes de la enfermedad. Al igual que en otros estudios sobre individuos con SII, se observa que los pacientes con SGNC tienen una tendencia a reducir las bacterias Gram negativas del filo *Bacteroidetes* y aumentar las Gram positivas del filo *Firmicutes*. Los resultados indican también que tanto en la dieta baja en FODMAP y en la DSG se reduce la cantidad de *Bifidobacterias*, aunque solamente se alcanza un nivel estadístico significativo en pacientes con SGNC. El efecto de las dietas en la variación de la microbiota es más pronunciado en la SGNC que en los controles lo que sugiere que la microbiota de estos pacientes es más susceptible a los cambios de nutrientes, mientras que la microbiota de individuos sanos tiene mayor estabilidad.

Por tanto, todos estos resultados apoyan que existirían unas condiciones propicias que actúan de forma simultánea y que, en determinados individuos, junto

con el consumo de cantidades normales de ATIs se amplifica la activación del sistema inmune innato, como: (1) una población bacteriana pobre o disminuida en *Bifidobacterias/Lactobacillus*, (2) un aumento de los niveles de LPS bacterianos, (3) un defecto en la producción de FAI incapaz de inhibir la actividad de los LPS, incluso (4) defectos genéticos o epigenéticos en la expresión de los TLRs que hacen que los individuos sean más susceptibles a las infecciones por bacterias Gram negativas. Condiciones que pueden ser consecuencia, entre otros, de una dieta incorrecta, baja en fibra insoluble, en almidón resistente, FOS y GOS, alta en grasas y proteínas, un estilo de vida con niveles elevados de estrés, una infección bacteriana, el consumo de antibióticos o de antiinflamatorios no esteroideos (AINES). En este sentido, la modulación de la composición de la microbiota es una de las vías más prometedoras para el tratamiento de diversas patologías como el SII, la obesidad, la alergia, la diabetes, incluso para la SGNC (Clemente *et al.*, 2012). Esta modulación pasaría por incidir en una dieta que preservara unos niveles adecuados de los metabolitos necesarios para mantener una microbiota sana y reducir la inflamación, como son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), con la administración de probióticos/prebióticos que intervinieran en la restauración de bacterias productoras de AGCC, como las *Bifidobacterias*, y favorecieran el aumento de la producción de estos metabolitos, como los *Lactobacillus* (Leccioli *et al.*, 2017; Lewis *et al.*, 2010; Lin y Zhang, 2017; Rivière *et al.*, 2016).

## 4.5 Determinación de ATIs

Sería conveniente conocer el contenido de ATIs en los alimentos, tanto en su estado crudo como procesado, con el fin de evitar o reducir este tipo de alimentos durante situaciones más vulnerables del SGI. Para ello, es necesario disponer de las

mejores técnicas instrumentales para su detección y cuantificación, así como de biomarcadores característicos para poder medir su actividad proinflamatoria.

Existen dos técnicas analíticas para identificar proteínas proinflamatorias en los alimentos. La primera es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que está basada en el reconocimiento de anticuerpos monoclonales o policlonales de una o más proteínas alergénicas. Es la técnica más usada comercialmente, aunque dependiendo de la matriz donde se encuentra la proteína y del procesado podría no tener ninguna sensibilidad (Croote y Quake, 2016). Por este motivo, el ensayo ELISA, podría no ser suficientemente sensible para la identificación de proteínas de alimentos que han sido tratados térmicamente. La segunda técnica, ampliamente utilizada para la identificación de proteínas en plantas, es la detección e identificación por espectrometría de masas (MS), óptima en el caso que se requiera la confirmación de la composición, estructura y secuencia de aminoácidos, pero más compleja y con coste más elevado que el ensayo ELISA (Mari *et al.*, 2010; Monaci y Visconti, 2009).

Gracias a la MS se han podido identificar gran cantidad de ATIs en diversas matrices, principalmente en cereales. Aunque no hay un procedimiento único o estandarizado, se han identificado dos estrategias de análisis de ATIs mediante MS. La primera, identifica los ATIs con potencial alergénico por inmunotransferencia, se aíslan y posteriormente se caracterizan por MS (Akagawa *et al.*, 2007; Goliáš *et al.*, 2013; Lang *et al.*, 2013; Pastorello *et al.*, 2007; Šotkovský *et al.*, 2011;). En esta estrategia la clave es disponer del biomarcador que indique una alteración del SGI. De esta forma, en la alergia al trigo se utilizan los anticuerpos IgE y en la EC los anticuerpos IgG y IgA, en el caso de SGNC todavía no hay biomarcadores característicos. La segunda estrategia identifica y cuantifica por técnicas de MS, los



péptidos característicos resultado de la digestión de las proteínas (Flodrová *et al.*, 2015; Fontanini *et al.*, 2007; Prandi *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 2016; Uvackova *et al.*, 2013). En este caso, esta estrategia trae consigo varias suposiciones: que el proceso de extracción y separación son óptimos, y que la digestión es completa y reproducible, es decir, existe una relación entre la concentración de los péptidos y de la proteína original (Li *et al.*, 2017; Ong y Mann, 2005). Es importante tener en cuenta que, para dar valores cuantitativos del contenido en ATIs, sería necesario estándares semejantes a la muestra a analizar de los cuales se conozca su concentración en la matriz a estudiar, así como tener un criterio único en las unidades facilitando la comparación de los resultados de los diversos trabajos (Elliot *et al.*, 2009; Sancho y Mills, 2010; Wang y Giese, 2017).

Para la detección y cuantificación de los ATIS, hay tres etapas que se repiten en la mayoría de los trabajos, (1) extracción de la fracción proteica por diferencia de solubilidad, (2) separación y purificación de los ATIs mediante técnicas de electroforesis y cromatografía de líquidos, y (3) detección por MS.

Actualmente, aunque no hay un método estandarizado para la extracción de los ATIs, se han identificado en las tres fracciones definidas por Osborne (1907), albuminas/globulinas, gliadinas y gluteninas, siendo la fracción de las albuminas/globulinas donde se encuentran la mayor cantidad (Pastorello *et al.* 2007). De hecho, y de acuerdo con la revisión realizada, el 85% de los trabajos revisados han utilizado, para la separación de los ATIs, la fracción soluble con soluciones salinas, albuminas/globulinas, aunque existen protocolos en que los ATIs se han caracterizado sobre otra fracción diferente (Cuccioloni *et al.* 2016; Flodrová *et al.* 2015).

Hay que tener en cuenta que, en cualquier proceso analítico, la eficacia del análisis depende en gran medida del método de extracción y de la pureza de la fracción extraída. Para mejorar la extracción de las proteínas, se utilizan agentes reductores como la urea o el ditioneitol (DTT), ya que el procesado de los alimentos a temperaturas elevadas hace que las proteínas estén parcialmente desnaturalizadas y agregadas siendo menos solubles. En consecuencia, la utilización de estos agentes y elevadas concentraciones de sales para mejorar la extractabilidad, puede tener efectos negativos en la identificación posterior, influyendo en la ionización del analito y reduciendo considerablemente la intensidad de la señal (Heink *et al.*, 2012). Esto se observa en el único ensayo interlaboratorio encontrado, demostrando que, aunque la solución basada en urea es con la que se consigue obtener una mayor extracción de proteínas de las semillas de arroz, la extracción con soluciones salinas basadas en NaCl es la que consigue mejor representación de las proteínas en las bandas de electroforesis (Sato *et al.* 2016).

El proceso más utilizado para la separación de los ATIs es la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Este método, permite la separación de proteínas en una muestra compleja de acuerdo con su movilidad electroforética, además sirve como método de identificación. En la mayoría de los artículos revisados utilizan la cromatografía líquida (LC) de forma previa y/o posterior para mejorar la eficacia de la separación. Varios trabajos revisados emplean una segunda electroforesis (segunda dimensión, 2D), mayoritariamente de isoelectroenfoque (IEF), técnica que permite el fraccionamiento de proteínas en su estado nativo por su punto isoeléctrico (pI). En estos casos, se observa que ciertos ATIs no se detectan en la 2D, posiblemente debido a que después de la primera separación, los puentes disulfuro se regeneran, induciendo a la formación de macroagregados que luego se entrelazan impidiendo que los ATIs penetren en las fibras de gel de poliacrilamida y

migrar a su respectiva masa molecular en la 2D (Akagawa *et al.* 2007; Kitta *et al.*, 2006; Satoh *et al.*, 2016; Teshima *et al.*, 2010).

Previamente a la introducción del analito en el MS y una vez realizada la etapa de separación por electroforesis, las bandas que se encuentran sobre 14-16 kDa son utilizadas para una digestión enzimática, normalmente con tripsina (Han *et al.*, 2008; Monaci y Visconti, 2009). En este sentido, es fundamental la ruptura total de las proteínas para una buena medida, esta ruptura se podría conseguir con la optimización de las enzimas utilizadas y los tiempos de digestión. En un trabajo realizado para identificar el inhibidor CM3 en diferentes variedades de trigo, se observó que la digestión enzimática con tripsina no daba resultados satisfactorios (Prandi *et al.*, 2013). Realizaron el proceso de digestión en dos fases, la primera con pepsina (0-180 min.) y la segunda con una mezcla de tripsina/quimiotripsina (180-420 min.) obteniendo la ruptura total de las proteínas.

Para la identificación y cuantificación de los ATIs se han utilizado diferentes combinaciones de espectrómetros de masas, siendo las fuentes de ionización denominadas *soft-ionization* las que se están utilizando de forma mayoritaria (74% de los artículos revisados). El uso de combinaciones de espectrómetros permite la mejor resolución y detección de los péptidos, además, según la técnica empleada, es posible obtener datos absolutos de la concentración de ATIs en diferentes matrices.

Entre estas técnicas, se ha utilizado el método de análisis MS<sup>E</sup> en un espectrómetro UPLC-QTOF para el análisis cuantitativo de las proteínas alergénicas del trigo (Uvackova *et al.* 2013). Este método tiene la capacidad de identificar, en un solo ensayo, múltiples proteínas en una matriz compleja. Realizan la toma de datos de forma paralela a baja y alta energía y en un solo análisis, detecta péptidos

portadores de epítomos clínicamente relevantes y cuantifica la masa exacta de la proteína progenitora (Plumb *et al.*, 2006).

Otra técnica innovadora utilizada es HPLC-LTQ-OrbiTrap (Sistema híbrido de espectrómetro de masas Orbitrap y trampa iónica) para verificar la identidad del inhibidor CM3 del trigo duro separado por SDS-PAGE, un HPLC-ESI-MS/MS para identificar la secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos, y usando uno de los péptidos como patrón para la determinación cuantitativa, se consiguió conocer el contenido de CM3 de diferentes cultivares y zonas de cultivo. Se observó importantes variaciones de 0,22 a 1,11 mg por gramo de trigo (Prandi *et al.* 2013).

En otro trabajo se empleó la técnica de marcaje isobárico (iTRAQ) para comparar el contenido de ATIs en el cereal crudo y el cereal procesado. Primero utilizan el espectrómetro MALDI-TOF MS/MS para la identificación de las proteínas de cada una de las muestras. Posteriormente para su cuantificación relativa por pares, cebada/malta y trigo/cuscús, se realiza un marcaje iTRAQ seguido con el análisis MALDI-TOF MS/MS, observándose la diferencia de señal de los ATIs entre los alimentos procesados comparados con el cereal en crudo. Se confirma que en ambos cereales la cantidad de los ATIs disminuyen en los alimentos procesados, siendo más de un 70% en el cuscús, aunque en la malta se observa que hay dos ATIs, CM16, CM3, que aumentan ligeramente (Flodrová *et al.* 2015).

Por último, se ha encontrado un trabajo reciente en el que se describe un método específico de LC-MS/MS utilizando péptidos etiquetados con isótopos estables como estándares internos (análisis por dilución isotópica, IDA), para obtener las concentraciones de ATIs (0.19, 0.28, 0.53, CM2, CM3 y CM16) en granos de diferentes variedades de trigo que han crecido en las mismas condiciones (trigo común, trigo duro, espelta, trigo emmer y einkorn). El análisis reveló que el trigo

einkorn contiene cantidades muy bajas de ATIs, en cambio, la espelta y el trigo emmer tenían un contenido global de ATIs más elevado que el trigo común, teniendo el trigo duro un contenido intermedio (Geisslitz *et al.* 2018).

Esta revisión pone en relieve la variedad de métodos utilizados para identificar proteínas con propiedades inflamatorias con su consumo. Se observa que no existe un método único y que son difíciles de comparar debido a que la mayoría de los trabajos no publican datos de límites de detección y límites de cuantificación. En cualquier caso, el problema principal en relación con el análisis cuantitativo de ATIs, es que no existe un método rápido, fiable, contrastable y económicamente viable a utilizar como control en el análisis rutinario de los alimentos.

Por estas razones, sería de especial interés alcanzar un consenso en los métodos de análisis, así de disponer de los patrones o materiales de referencia imprescindibles para validar cualquier método usado por los laboratorios prioritariamente a través de un estudio interlaboratorio. En este sentido, sólo se ha encontrado un estudio de estas características relacionado con los ATIs y sobre alérgenos contenidos en el arroz (Satoh *et al.*, 2016). Este ejercicio sería una magnífica herramienta que podría ayudar a evitar fuentes de error, establecer procedimientos de trabajo entre laboratorios y disponer de un método estandarizado.



# Conclusiones







## 5. Conclusiones

---

1. La literatura publicada hasta la fecha considera a las gliadinas del gluten promotoras de la SGNC. Los trabajos más recientes sugieren que también podrían estar involucrados los FODMAPs, así como los ATIs.
2. La revisión de los estudios realizados indica que los ATIs pueden actuar como contaminantes del gluten y aparecer como un activador potencial de la inmunidad innata en pacientes con SGNC dado que se ha demostrado que son unos fuertes activadores de la respuesta del sistema inmune innato provocando un aumento de la expresión de los TLR4 en el intestino.
3. Los estudios publicados sobre la activación del sistema inmune innato por los ATIs ponen de manifiesto que en los cereales que contienen gluten (trigo, cebada y centeno) incrementan la respuesta. Así mismo, la respuesta del sistema inmune es dependiente del contenido en ATIs del cereal, variando en función de la zona de cultivo y del tipo de procesado, siendo mayor en el cereal en crudo que en el procesado. Esta revisión señala que el potencial de activación está vinculado con el tipo de inhibidor del alimento, su estado de agregación, la disposición de las hélices  $\alpha$  y la cantidad de puentes de disulfuro.
4. El factor previo para que haya una traslocación de ATIs al lumen intestinal y que tenga lugar toda la cadena de señales vinculadas con la activación del sistema inmune innato, pasa por carecer de una barrera intestinal íntegra. Otros factores que predisponen a una mayor sensibilidad junto a la ingesta de ATIs es

## *Conclusiones*

la presencia de una población bacteriana pobre en productores de butirato y/o disminuida en *Bifidobacterias/Lactobacillus*, niveles elevados de lipopolisacáridos bacterianos y defectos en la producción de la fosfatasa alcalina intestinal.

5. Aunque los métodos analíticos basados en inmunoensayos son utilizados por su rapidez y selectividad, sin lugar a dudas, una identificación unívoca y cuantificación de acuerdo con las normas europeas de calidad requerirá en primer lugar, el aislamiento y purificación de los ATIs mediante un proceso basado en la electroforesis mono o bidimensional del extracto proteico del cereal objeto del análisis y en segundo lugar, un análisis mediante espectrometría de masas de alta resolución.

# Publicaciones en revistas científicas





## 6. Publicaciones en revistas científicas

**nutrición clínica**  
y  
Dietética Hospitalaria

Artículo de Revisión

Nutr. clín. diet. hosp. 2017; 37(1):171-182  
DOI: 10.12873/371manyesfont

### Sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC): manejo nutricional de la enfermedad

#### Non-Celiac Gluten Sensibility (NCGS): Nutritional management of the disease

Reig-Otero, Yolanda; Mañes, Jordi; Manyes i Font, Lara

Laboratorio de Seguridad Alimentaria y Toxicología. Universitat de València. Burjassot (València).

Recibido: 1/junio/2016. Aceptado: 26/octubre/2016.

#### RESUMEN

La sensibilidad al gluten no celiaca es un trastorno relevante del que no existen en la actualidad suficientes estudios científicos ni biomarcadores específicos para identificar claramente esta patología de forma separada de otros trastornos gastrointestinales. El diagnóstico tardío de este trastorno, conduce al paciente a una serie de desórdenes, no necesariamente del ámbito intestinal, que pueden desembocar en una enfermedad crónica, autoinmune, inflamatoria o neoplásica. Los síntomas del trastorno no suelen ser reportados de forma inmediata a los profesionales de la salud, dado que muchos de los pacientes afectados no los consideran de relevancia dentro de su patología de base, igualmente, no los relacionan con una posible sensibilidad al gluten, o creen que estos problemas son derivados de la edad o de otras situaciones (malas digestiones, comidas copiosas, efectos adversos a la medicación). Por otro lado, los análisis realizados a los pacientes que presentan estos síntomas para descartar una posible celiacía o una intolerancia alimentaria, suelen dar negativos, descartando de entrada que el gluten esté implicado en estos trastornos. Esto hace que sea una enfermedad que puede afectar de forma sutil al organismo, y que podría conllevar complicaciones más graves.

#### PALABRAS CLAVE

Sin gluten, celiacía, hipersensibilidad al trigo, gliadina, terapia nutricional.

**Correspondencia:**  
Lara Manyes i Font  
lara.manyes@uv.es

#### ABSTRACT

The Non-Celiac Gluten Sensibility is a relevant disorder that there are not enough scientific studies and specific biomarkers to identify strictly this pathology separately from others gastrointestinal disorders. The later diagnosis could lead to a number of pathologies, not necessarily in the intestinal area, which can lead to a chronic, autoimmune, inflammatory or neoplastic disease. The symptoms are not usually reported immediately to healthcare professionals, given that many of the affected patients do not consider relevant in its base pathology, likewise not relate to a possible sensitivity to gluten, or they believe that these problems are derived from age or other situations (indigestion, heavy meals, medication side effects). Furthermore, tests performed to patients with these symptoms to rule out celiac disease or food intolerance, often are negative discarding that gluten is involved in these disorders. This makes it a disease that is affecting slowly patient's health that could lead to more serious complications.

#### KEY WORDS

Gluten-Free; Celiac Disease; Wheat Hypersensitivity, Gliadin; Nutrition Therapy.

#### ABREVIATURAS

EC: Enfermedad Celiaca.

AG: Alergia al gluten.

SGNC: Sensibilidad al gluten no celiaca.

HLA: Antígenos leucocitarios humanos.

DSG: Dieta sin gluten.



## Amylase–Trypsin Inhibitors in Wheat and Other Cereals as Potential Activators of the Effects of Nonceliac Gluten Sensitivity

Yolanda Reig-Otero, Jordi Mañes, and Lara Manyes

*Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Valencia, Spain.*

**ABSTRACT** Nonceliac gluten sensitivity (NCGS) is a gluten-related gastrointestinal disorder distinct from celiac disease (CD) and gluten allergy that is not easy to diagnose due to the lack of biomarkers. It is characterized by intestinal symptoms and extraintestinal manifestations with the consumption of gluten-containing foods. In contrast to CD, NCGS patients do not present a genetic predisposition or intestinal villi atrophy. Recent studies question the proinflammatory triggering activity of  $\alpha$ -gliadin fraction contained in wheat, since it has been demonstrated that the amylase–trypsin inhibitors (ATIs) exert a strong activating effect on the innate immune response. We aimed to analyze the role of ATIs in the activation of innate immunity and in the development of the symptoms characteristic of NCGS. A systematic literature search was made using databases such as MEDLINE, SciELO, Science Direct, and Scopus, with focus on key words such as “amylase–trypsin inhibitors,” “wheat,” “gluten,” and “celiac.” Many studies are available on the structure, inhibition mechanism, and immune system effects of ATIs, mainly focused on IgE-mediated reactions. Recently, with the increase of NCGS interest, has increased the literature on the capacity of ATIs contained in wheat to activate the innate immune system. Literature published to date questions the relationship between activation of the innate immune system and gluten in NCGS. ATIs may have acted as interfering contaminant of gluten and appear as potential activator of innate immunity in NCGS patients. In view of their potential impact, more interventional studies are needed to demonstrate the proinflammatory effect of ATIs.

**KEYWORDS:** •  *$\alpha$ -amylase–trypsin inhibitors* • *gluten* • *gluten sensitivity* • *immunity innate* • *wheat*

### INTRODUCTION

NONCELIAC GLUTEN SENSITIVITY (NCGS) is a gluten-related disorder broadly defined as a reaction to gluten in which both allergic and autoimmune gastrointestinal mechanisms have been discarded (diagnosis through exclusion).<sup>1</sup>

The disease is characterized by intestinal symptoms (diarrhea or constipation, abdominal pain, meteorism, postprandial fullness, etc.) and extraintestinal manifestations (headache, fatigue, depression, muscle pain, dermatitis, anemia, etc.) in patients with no evident diagnosis of celiac disease (CD) or gluten allergy (GA). These patients experience notorious improvement with a gluten-free diet (GFD), and the symptoms return when gluten is reintroduced.<sup>2–4</sup> The prevalence of NCGS is unclear—the few available data ranging from 0.6% to 10%.<sup>5,6</sup>

At present there are no clear diagnostic biomarkers for NCGS. The diagnosis can only be established through the exclusion of other disorders once negative diagnostic test results have been obtained mainly for CD and GA. In view

of the lack of such biomarkers and the need to standardize a diagnostic protocol, in 2014, the *Third International Expert Meeting in Gluten-Related Disorders* reached consensus as to how the diagnosis of NCGS should be confirmed. A two-step protocol was defined, comprising a first step involving the follow-up of patients with GFD, and a second step in which the effect of gluten reintroduction in the diet is assessed.<sup>7</sup> The lack of a strict diagnostic criterion has resulted in overlapping identification of irritable bowel syndrome (IBS) and NCGS.<sup>8,9</sup> NCGS symptoms usually are diagnosed under the umbrella of the IBS (bloating, abdominal pain, and irregular bowel movements). IBS reactions have been related to gluten, lactose, milk protein, and FODMAPs.<sup>10</sup> NCGS patients, however, often report symptoms such as headache and/or foggy mind, which cannot be related to lactose and/or FODMAP intolerance.

While the pathogenic mechanism underlying CD has been clearly related to T cell activation in the gastrointestinal mucosa, the pathogenesis of NCGS remains unclear.<sup>10,11</sup> CD is an autoimmune disorder in which genetic predisposition plays an important role, being strongly linked to class II human leukocyte antigens HLA-DQ2 and HLA-DQ8. In CD, both innate and adaptive immunities play a key role in the development of the disease, while in NCGS only activation of the innate immune response appears to be implicated. The absence of gluten-reacting T cells in NCGS and the lack of an

Manuscript received 1 February 2017. Revision accepted 14 August 2017.

Address correspondence to: Lara Manyes, PhD, Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés 46, Valencia 46100, Spain. E-mail: lara.manyes@uv.es





## Análisis de los inhibidores de las $\alpha$ -amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal.

Reig-Otero Y.<sup>1</sup>, Mañes J.<sup>1</sup>, Juan-García, C.<sup>1</sup>, Manyes L.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Medicina Preventiva i Salut Pública. Facultat de Farmàcia. Universitat de València.

**Resumen:** Las plantas han desarrollado un sistema de resistencia a insectos y plagas mediante la síntesis de compuestos como los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas y/o las proteasas digestivas, proteínas que actúan también contra las enzimas digestivas de mamíferos. Diversos estudios han demostrado su implicación en la activación del sistema inmune y posiblemente, en la sintomatología de patologías como la Sensibilidad al Gluten no Celiaca, siendo esta reacción proporcional al contenido en el cereal. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las diferentes estrategias para la extracción, purificación, detección y cuantificación de estas proteínas en el trigo y en otros cereales de la dieta actual. Esta revisión incluyó los métodos de análisis con espectrometría de masas del periodo 2000 - 2017, identificándose 114 artículos relevantes de los que se seleccionaron 26. Actualmente no existe un método estandarizado de control que permita determinar estas proteínas de forma clara, concisa y fiable.

### Palabras clave:

Proteínas de las plantas; Inhibidores de las proteasas; Hipersensibilidad al trigo; Enfermedad Celiaca; Espectrometría de Masas.

**Abstract:** *Analysis of Amylase/Trypsin's Inhibitors contained in wheat and other cereals: potential promoters of intestinal inflammation.*

Plants have developed a system of resistance to insects and pests through the synthesis of certain compounds such as alpha-amylase inhibitors and/or digestive proteases, proteins that can also act against digestive enzymes of mammals. Studies have shown their involvement in the activation of the immune system and possibly in the symptomatology of non-coeliac Gluten Sensitivity, being the reaction proportional to cereal content. The objective of this study was to review the different strategies used for extraction, purification, detection and quantification of these inhibitors in wheat and other cereals of the current diet. A review of the literature published between 2000-2017 on methods of analysis by mass spectrometry was carried out. 114 relevant articles were identified from which 26 were selected for review. At present, there is no standardized control method for the clear, concise and reliable determination of these proteins.

### KeyWords:

Plant Proteins; Protease Inhibitors; Wheat Hypersensitivity; Celiac Disease; Mass Spectrometry

### Introducción

Los cereales y las legumbres son la base alimentaria en nuestra dieta actual. Los cereales son la fuente más importante de nutrientes contribuyendo al 50% de las calorías de la dieta (Keranev, 2010). Las legumbres constituyen la fuente principal de proteínas en Latinoamérica, África y este de Asia (Flight y Clifton, 2006). Se han asociado varios compuestos de estos alimentos con mecanismos de defensa contra la depredación de insectos y la resistencia a la infección, como la familia de los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas y las proteasas, proteínas que actúan inhibiendo las enzimas digestivas de los insectos y en algunos casos inhibiendo la de los mamíferos (Dang y Van Damme, 2015). Son moléculas tridimensionales formada por uniones disulfuro y se presentan como estructuras monoméricas de 5 a 16 kDa, homodiméricas de 26 kDa o tetraméricas de 50 kDa

(Franco et al., 2002). Debido a su naturaleza proteica son termolábiles, se desnaturalizan con el calor durante el cocinado, aunque se ha comprobado que no pierden totalmente la capacidad de inhibición (Zevallos et al., 2017; Pastorello et al., 2007).

Los primeros inhibidores aislados fueron el inhibidor Kunitz y Bowman-Birk de la soja en 1940 y el inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa de cereales (Kneen y Sandstedt, 1943; Kunitz, 1945; Bowman, 1946). Desde entonces se han identificado y caracterizado numerosos inhibidores en un amplio espectro de especies vegetales debido principalmente al interés en modificar su expresión para el control de las plagas o para tratar la diabetes y la obesidad (Vasil, 2007; Barrett y Udani, 2011; Dang y Van Damme, 2015). Recientemente se han vinculado los inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa y la tripsina (ATIs) del trigo y de otros cereales con diversas patologías gastrointestinales, como la Enfermedad Celiaca (EC) y la Sensibilidad al Gluten no Celiaca (SGNC), por ser fuertes activadores de la respuesta del sistema inmune innato (Junker et al. 2012; Zevallos et al., 2017; Reig-Otero et al., 2017).

En 1943 se observó por primera vez que una proteína del endospermo del trigo era capaz de inhibir la amilasa salival y desde que se aislaron en 1973, se han relacionado con reacciones de hipersensibilidad IgE, como el asma del panadero y la alergia al trigo, así como en reacciones alérgicas cruzadas entre el trigo y el arroz (Silano et al., 1973; Mills et al., 2004; Salcedo et al., 2011; Junker et al. 2012; Villalta et al., 2012). Desde entonces se han publicado estudios para entender su estructura, el mecanismo de inhibición y su efecto sobre el sistema inmunitario (Carbonero et al., 1999; Payan 2004; Salcedo et al., 2011; Altenbach et al., 2011; Huebener et al., 2015).

En base al estado de agregación se pueden encontrar varios tipos de inhibidores de la  $\alpha$ -amilasa en el trigo (figura 1): monoméricos o proteínas 0.28, homodiméricos o proteínas 0.19 y 0.55, y los heterotetraméricos, referidos como proteínas CM. Los inhibidores de la tripsina son monoméricos o inhibidores CMx (Sherry y Casey, 1999).

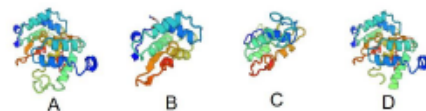


Figura 1: Representación de las estructuras 3D de varios inhibidores de la familia de los cereales: Inhibidor de la amilasa y la tripsina del trigo A) 0.53 B) 0.28 C) CM3 D) 0.19. Fuente: Swiss-Model Repository <https://swissmodel.expasy.org/repository>.

La posible implicación de estas proteínas en la EC, la SGNC y otras enfermedades inflamatorias, precisa disponer de las mejores técnicas instrumentales para su detección y cuantificación, así como de mecanismos para medir la actividad proinflamatoria del SGI (sistema gastrointestinal) de los cereales crudos y de los alimentos que los contienen. El mayor problema que existe es la inexistencia de procedimientos fiables de análisis y la ausencia de estudios interlaboratorio que los validen.

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de las técnicas más recientes de extracción, purificación, detección y cuantificación de los ATIs mediante espectrometría de masas (MS) principalmente del trigo y de otros cereales tanto en crudo como en alimentos procesados.

### Metodología

Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura científica existente

\*e-mail: lara.manyes@uv.es



# Contribuciones a congresos





## 7. Contribuciones a congresos

---

- 1.** Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. ¿Es el gluten el causante de la SGNC? En: V Congreso de estudiantes de nutrición humana y dietética, 17 y 18 de abril de 2018, Valencia: Facultat de Farmàcia de la Universitat de València.



¿Es el gluten el causante de la SGNC?

Y. Reig-Otero, J. Mañes, L. Manyes

Departament de Medicina preventiva, Salut pública, Ciències  
de l'alimentació, Toxicologia i Medicina legal.

Facultat de Farmàcia. Universitat de València. España

[yoreigo@alumni.uv.es](mailto:yoreigo@alumni.uv.es)

La Sensibilidad al Gluten no Celiaca (SGNC) es una patología gastrointestinal enmarcada dentro de los desórdenes relacionados con el gluten, definiéndose de forma tan general como aquellos casos de reacción al gluten en donde se ha descartado tanto los mecanismos gastrointestinales autoinmunes como los alérgicos, reacción que desaparece con una dieta sin gluten y que vuelven a reaparecer con su introducción. No es fácilmente diagnosticable debido a la inexistencia de biomarcadores que la identifiquen. Se caracteriza por síntomas intestinales y extraintestinales, y por ausencia de una predisposición genética y de atrofia de las vellosidades intestinales como ocurre en la enfermedad celiaca. Recientes estudios analizan la influencia del gluten y/u otros componentes del trigo como los inhibidores de la amilasa y tripsina (ATIs) o los carbohidratos de cadena corta rápidamente fermentables (FODMAPS) en la sintomatología de la SGNC. El objetivo fue analizar el rol de la familia de los ATIs del trigo y otros cereales en la SGNC. Para ello se ha realizado una revisión sistemática de la literatura científica publicada hasta el momento para analizar la relación de los ATIs con la SGNC. Los ATIS del trigo son potentes activadores del sistema inmune innato, respuesta que es dependiente de la dosis. Su función en el cereal es la protección y defensa contra parásitos y hongos, siendo el contenido de esta proteína variable en función del genotipo del trigo y de las condiciones ambientales que esté sometido. Son proteínas resistentes a las proteasas del intestino y están involucradas en diversas patologías como la alergia del panadero. La literatura publicada cuestiona la vinculación del gluten con la activación del sistema inmune innato en la SGNC. En conclusión, los ATIS son potenciales componentes de la dieta a modificar, disminuir o eliminar para minimizar el posible efecto proinflamatorio del trigo.

Palabras clave: Gluten, Trigo, Sensibilidad al gluten, Inhibidores de las amilasas





# Bibliografía





## 8. Bibliografía

---

Akagawa M, Handoyo T, Ishii T, Kumazawa S, Morita N, Suyama K. Proteomic analysis of wheat flour allergens. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 6863-6870.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 499-511.

Altenbach SB, Veshel WH, Dupont FM. The spectrum of low molecular weight alphaamylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Res. Notes* 2011; 4: 242-242.

Andrade MER, Araújo RS, de Barros PAV, Soares ADN, Abrantes FA, Generoso SdV, et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clin. Nutr.* 2015; 34:1080-1087.

Aufiero VR, Fasano A, Mazarella G. Non-Celiac Gluten Sensitivity: How Its Gut Immune Activation and Potential Dietary Management Differ From Celiac Disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 2018; 26: e1700857.

Aziz I, Lewis NR, Hadjivassiliou M, Winfield SN, Rugg N, Kelsall A et al. A UK study assessing the population prevalence of self-reported gluten sensitivity and referral characteristics to secondary care. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2014; 26: 33–39.

Aziz I, Hadjivassiliou M, Sanders DS. Self-reported gluten sensitivity: an inter-national concept in need of consensus?. *Am. J. Gastroenterol.* 2014; 109: 1498–1499.

Aziz I, Hadjivassiliou M, Sanders DS. The spectrum of noncoeliac gluten sensitivity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2015; 12: 516–526.

ClinicalTrials.gov. Bakery Products for Non-Coeliac Gluten Sensitive Consumers. Consultado en agosto de 2018. Disponible en: <https://goo.gl/EHRk9x>

Barrett JS, Geary RB, Muir JG. et al. Dietary poorly absorbed, short-chain carbohydrates increase delivery of water and fermentable substrates to the proximal colon. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010; 31: 874–882.

## Bibliografía

Barrett ML, Udani JK. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr. J.* 2011; 10: 24-24.

Bethune MT, Khosla C. Oral enzyme therapy for celiac sprue. *Meth. Enzymol.* 2012; 502: 241-271.

Biesiekierski JR, Newnham ED, Irving PM, Barrett JS, Haines M, Doecke JD, et al. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* 2011; 106: 508–514.

Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterol.* 2013; 145: 320–328.

Bilski J, Mazur-Bialy A, Wojcik D, Zahradnik-Bilska J, Brzozowski B, Magierowski M, et al. The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* 2017; 2017: 9074601.

Bol-Schoenmakers M, Fiechter D, Raaben W, Hassing I, et al. Intestinal alkaline phosphatase contributes to the reduction of severe intestinal epithelial damage. *Eur. J. Pharmacol.* 2010; 633: 71-77.

Boukid F, Prandi B, Buhler S, Sforza S. Effectiveness of Germination on Protein Hydrolysis as a Way To Reduce Adverse Reactions to Wheat. *J. Agric. Food Chem.* 2017; 65 : 9854-9860.

Bowman DE. Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1946; 63(3): 547-550.

Brottveit M, Beitnes AR, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen F, et al. Mucosal Cytokine Response After Short-Term Gluten Challenge in Celiac Disease and NonCeliac Gluten Sensitivity. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108: 842-850.

Brouns F, van Buul V, Shewry P. Does wheat make us fat and sick?. *J. Cereal Sci.* 2013; 58: 209-215.

Brynychova I, Hoffmanova I, Dvorak M, Dankova P. Increased Expression of TLR4 and TLR7 but Not Prolactin mRNA by Peripheral Blood Monocytes in Active Celiac Disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2016; 25: 887-893.

Caio G, Volta U, Tovoli F, De Giorgio R. Effect of gluten free diet on immune response to gliadin in patients with non-celiac gluten sensitivity. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14: 26.

Capocchi A, Muccilli V, Cunsolo V, Saletti R, Foti S, Fontanini D. A heterotetrameric alpha-amylase inhibitor from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *Phytochemistry* 2013; 88: 6-14.

Carbonero Z, García P, Olmedo F. A multigene family of trypsin/ $\alpha$ -amylase inhibitors from cereals. In: Sherry R, Casey R. Seed proteins. Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999. p. 617-633.

Cario, E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54: 1182-1193.

Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, Soresi M, D'alcamo A, Cavataio F. Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am. J. Gastroenterol.* 2012; 107: 1898-1906.

Carroccio A. Searching for the immunological basis of wheat sensitivity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 13: 628-630

Carroccio A, Giambalvo O, La Blasca F, Iacobucci R, D'Alcamo A, Mansueto P. Self-reported Non-Celiac Wheat Sensitivity in High School Students: Demographic and Clinical Characteristics. *Nutrients* 2017; 9: 771.

Castillo N, Theethira T, Leffler D. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterol. Rep. (Oxf)* 2015; 3: 3-11

Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, et al. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann. Med.* 2010; 42: 530-538.

Catassi C, Elli L, Bonaz B, Bouma G, Carroccio A, Castillejo G, et al. Diagnosis of NonCeliac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients* 2015; 7: 4966-4977.

## Bibliografía

Catassi G, Lionetti E, Gatti S, Catassi C. The low FODMAP diet: many question marks for a catchy acronym. *Nutrients* 2017; 9: 292.

CCM. China Chemicals Market. Genetically Modified Wheat - different views between China and US to be enlarged. Consultado en marzo de 2016. Disponible en: <https://goo.gl/Zxuc4n>.

Ciacci C, Maiuri L, Caporaso N, Bucci C, del Giudice L, Rita Massardo D et al. Celiac disease: in vitro and in vivo safety and palatability of wheat-free sorghum food products. *Clin. Nutr.* 2007; 26: 799–805.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 2012; 148: 1258–1270.

Cooper BT, Holmes GK, Ferguson R, Thompson RA, Allan RN, Cooke WT. Glutensensitive diarrhea without evidence of celiac disease. *Gastroenterol.* 1980; 79: 801806.

Croote D, Quake SR. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. *NPJ Syst. Biol. Appl.* 2016; 2: 16022.

Croese J, Giacomini P, Navarro S, et al. Experimental hookworm infection and gluten microchallenge promote tolerance in celiac disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2015; 135: 508-516.

Cseh Á, Vásárhelyi B, Szalay B, Molnár K, Nagy-Szakál D, Treszl A, et al. Immune phenotype of children with newly diagnosed and gluten-free diet-treated celiac disease. *Dig. Dis. Sci.* 2011; 56: 792-798.

Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Ali I, Bonfili L, Cecarini V, Eleuteri AM et al. Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding. *Food Chem.* 2016; 213: 571-578.

Dale HF, Hatlebakk JG, Hovdenak N, Ystad SO, Lied GA. The effect of a controlled gluten challenge in a group of patients with suspected non-coeliac gluten sensitivity: A randomized, double-blind placebo-controlled challenge. *Neurogastroenterol. Motil.* 2018; 30: e13332.

Dalla Pellegrina C, Perbellini O, Scupoli MT, Tomelleri C, Zanetti C, Zoccatelli G et al. Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 237: 146–153.

De Giorgio R, Volta U, Gibson PR. Sensitivity to wheat, gluten and FODMAPs in IBS: facts or fiction? *Gut* 2016; 65: 169-178.

DeGeeter C, Guandalini S. Food Sensitivities: Fact Versus Fiction. *Gastroenterol Clin North Am.* 2018; 47: 895-908.

De Punder K, Pruimboom L: The dietary intake of wheat and other cereal grains and their role in inflammation. *Nutrients* 2013; 5: 771–787.

De Zorzi M, Curioni A, Simonato B, Giannattasio M, Pasini G. Effect of pasta drying temperature on gastrointestinal digestibility and allergenicity of durum wheat proteins. *Food Chem.* 2007; 104: 353–363.

Di Sabatino A, Volta U, Salvatore C, Biancheri P, Caio G, De Giorgio R, et al. Small Amounts of Gluten in Subjects With Suspected Nonceliac Gluten Sensitivity: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015; 13: 1604-1612.

Dieterich W, Schuppan D, Schink M, Schwappacher R, Wirtz S, Agaimy A et al. Influence of low FODMAP and gluten-free diets on disease activity and intestinal microbiota in patients with non-celiac gluten sensitivity. *Clin. Nutr.* 2018; [Epub ahead of print].

DiGiacomo DV, Tennyson CA, Green PH, Demmer RT. Prevalence of gluten-free diet adherence among individuals without celiac disease in the USA: results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010. *Scand. J. Gastroenterol.* 2013; 48: 921-925

Dike WK, Weijers HA, Van de Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953; 42: 34-42.

Dunwell JM. Transgenic cereals: current status and future prospects. *J. Cereal Sci.* 2013; 59: 419-434.

## Bibliografía

Elli L, Tomba C, Branchi F, Roncoroni L, Lombardo V, Bardella MT, et al. Evidence for the Presence of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Patients with Functional Gastrointestinal Symptoms: Results from a Multicenter Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Gluten Challenge. *Nutrients*. 2016; 8: 84.

Ellis A, Linaker BD. Non-coeliac gluten sensitivity?. *Lancet* 1978; 1: 1358–1359.

Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass Spectrom*. 2009; 44: 1637-1660.

FACE. Federación de Asociaciones de Celíacos de España. <http://www.celiacos.org/dieta-sin-gluten/clasificacion-de-los-alimentos> (consultada en agosto de 2018).

Fasano A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiol. Rev*. 2011; 91: 151–175.

Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterol*. 2015; 148: 1195-1204.

Fawley J, Gourlay DM. Intestinal alkaline phosphatase: a summary of its role in clinical disease. *J. Surg. Res*. 2016; 202: 225-234.

Flodrová D, Benkovská D, Laštovičková M. Study of quantitative changes of cereal allergenic proteins after food processing. *J. Sci. Food. Agric*. 2015; 95: 983-990.

Fontanini D, Capocchi A, Muccilli V, Saviozzi F, Cunsolo V, Saletti R. et al. Dimeric inhibitors of human salivary  $\alpha$ -amylase from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *J. Agric. Food. Chem*. 2007; 55: 10452-10460.

Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Front. Microbiol*. 2016; 7: 1081.

Francavilla R, Cristofori F, Verzillo L, Gentile A, Castellaneta S, Polloni C et al. Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Crossover Trial for the Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity in Children. *Am. J. Gastroenterol*. 2018; 113: 421-430

Fritscher-Ravens A, Schuppan D, Ellrichmann M, Schoch S, Röcken C, Brasch J et al. Confocal endomicroscopy shows food-associated changes in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol*. 2014; 147: 1012-1020.



Geisslitz S, Ludwig C, Scherf KA, Koehler P. Targeted LC-MS/MS reveals similar contents of  $\alpha$ -amylase/trypsin-inhibitors as putative triggers of non-celiac gluten sensitivity in all wheat species except einkorn. *J Agric Food Chem*. 2018 [Epub ahead of print].

Gibson PR, Shepherd SJ. Personal view: food for thought—western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2005; 21: 1399-1409.

Gibson PR, Shepherd SJ. Evidence-based dietary management of functional gastrointestinal symptoms: The FODMAP approach. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2009; 25: 252-258.

Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, Sollid LM, Barro F. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107: 17023-17028.

Gil-Humanes J, Pistón F, Altamirano-Fortoul R, Real A, Comino I, Sousa C. Reduced gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS one* 2014; 9: e90898.

Goel G, King T, Daveson AJ, Andrews JM, Krishnarajah J, Krause R. Epitope-specific immunotherapy targeting CD4-positive T cells in coeliac disease: two randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 studies. *Lancet Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 2: 479-493.

Goliáš J, Humlová Z, Halada P, Hábová V, Janatková I, Tučková L. Identification of rice proteins recognized by the IgE antibodies of patients with food allergies. *J. Agric. Food Chem*. 2013; 61: 8851-8860.

Golley S, Corsini N, Topping D, Morell M, Mohr P. Motivations for avoiding wheat consumption in Australia: results from a population survey. *Public Health Nutr*. 2015; 18: 490-499.

Gómez L, Martín E, Hernández D, Sánchez-Monge R, Barber D, del Pozo V, et al. Members of the  $\alpha$ -amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS letters* 1990; 261: 85-88.

Gu A, Hao P, Lv D, Zhen S, Bian Y, Ma C et al. Integrated Proteome Analysis of the Wheat Embryo and Endosperm Reveals Central Metabolic Changes Involved in the

## Bibliografía

Water Deficit Response during Grain Development. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 8478-8487.

Guo S, Al-Sadi R, Said HM, Ma TY. Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *Am. J. Pathol.* 2013; 182: 375-387.

Halmos EP, Christophersen CT, Bird AR, Shepherd SJ, Gibson PR, Muir JG. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut*, 2015; 64: 93-100.

Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008; 12: 483-490.

Heick J, Fischer M, Popping B. Influence of sample extraction solutions on the detection of wheat proteins by mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2012; 95: 388-393.

Heredia-Sandoval NG, Islas-Rubio AR, Cabrera-Chávez F, Calderón de la Barca AM. Transamidation of gluten proteins during the bread-making process of wheat flour to produce breads with less immunoreactive gluten. *Food Funct.* 2014; 5: 1813-1818.

Hollon J, Puppa EL, Greenwald B, Goldberg E, Guerrerio A, Fasano A. Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with non-celiac gluten sensitivity. *Nutrients* 2015; 7: 1565-1576.

Huebener S, Tanaka CK, Uhde M, Zone JJ, Vensel WH, Kasarda DD et al. Specific nongluten proteins of wheat are novel target antigens in celiac disease humoral response. *J. Proteome Res.* 2015; 14: 503-511.

Isasi C, Tejerina E, Morán LM. Non-celiac gluten sensitivity and rheumatic diseases. *Reumatol. Clin.* 2016 ; 12: 4-10.

Junker Y, Zeissig S, Kim SJ, Barisani D, Wieser H, Leffler DA et al. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J. Exp.Med.* 2012; 209: 2095-2408.

Kabbani TA, Vanga RR, Leffler DA, Villafuerte-galvez J, Pallav K, Hansen J, et al. Celiac Disease or Non-Celiac Gluten Sensitivity? An Approach to Clinical Differential Diagnosis. *Am. J. Gastroenterol.* 2014; 109: 741-746.

Kaliszewska A, Martinez V, Laparra JM. Proinflammatory responses driven by non-gluten factors are masked when they appear associated to gliadins. *Food Chem. Toxicol.* 2016; 95: 89-95.

Kalliomäki M, Satokari R, Lähteenoja H, Vähämiko S, Grönlund J, Routi T, et al. Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2012; 54: 727-732.

Kitta K, Ohnishi-Kameyama M, Moriyama T, Ogawa T, Kawamoto S. Detection of lowmolecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 2006; 351: 290-297.

Koning F. Adverse Effects of Wheat Gluten. *Ann. Nutr. Metab.* 2015; 67: 8–14.

Kucek LK, Veenstra LD, Amnuaycheewa P, Sorrells ME. A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2015; 14: 285–302.

Laatikainen R, Koskenpato J, Hongisto SM, Loponen J, Poussa T, Huang X et al. Pilot Study: Comparison of Sourdough Wheat Bread and Yeast-Fermented Wheat Bread in Individuals with Wheat Sensitivity and Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients* 2017; 9: 1215.

Lähdeaho ML, Kaukinen K, Laurila K, Vuotikka P, Koivurova OP, Kärjä-Lahdensuu T et al. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. *Gastroenterol.* 2014; 146: 1649-1658.

Lallès JP. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutrition rev.* 2010; 68: 323-332.

Lang GH, Kagiya Y, Ohnishi-Kameyama M, Kitta K. Evaluation of extraction solutions for biochemical analyses of the proteins in rice grains. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013; 77: 126-131.

Laparra JM, Sanz Y. Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion. *J. Cell Biochem.* 2010; 109: 801-807.

Leccioli V, Oliveri M, Romeo M, Berretta M, Rossi P. A new proposal for the pathogenic mechanism of non-coeliac/non-allergic gluten/wheat sensitivity: piecing together the puzzle of recent scientific evidence. *Nutrients* 2017; 9: 1203.

## Bibliografía

Leffler DA, Kelly CP, Green PH, Fedorak RN, DiMarino A, Perrow W. Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: a randomized controlled trial. *Gastroenterol.* 2015; 148: 1311-1319.

Leonard M, Sapone A, Catassi C, Fasano A. Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *Jama* 2017; 318: 647-656.

Levy M, Blacher E, Elinav E. Microbiome, metabolites and host immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017; 35: 8-15.

Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm. Bowel Dis.* 2010; 16: 1138–1148.

Liang L, Pinier M, Leroux JC, Subirade M. Interaction of alphagliadin with polyanions: design considerations for sequestrants used in supportive treatment of celiac disease. *Biopolymers.* 2010; 93: 418-428.

Li H, Han J, Pan J, Liu T, Parker CE, Borchers CH. Current trends in quantitative proteomics—an update. *J. Mass Spectrom.* 2017; 52: 319-341.

Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.* 2017; 18: 2.

Lionetti E, Leonardi S, Franzonello C, Mancardi M, Ruggieri M, Catassi C. Gluten Psychosis: Confirmation of a New Clinical Entity. *Nutrients.* 2015; 7: 5532-5539.

Losurdo G, Giorgio F, Piscitelli D, et al. May the assessment of baseline mucosal molecular pattern predict the development of gluten related disorders among microscopic enteritis?. *World J Gastroenterol.* 2016; 22: 8017-8025.

Mamone G, Nitride C, Picariello G, Addeo F, Ferranti P, Mackie A. Tracking the Fate of Pasta (T. Durum Semolina) Immunogenic Proteins by in Vitro Simulated Digestion. *J. Agric. Food Chem.* 2015; 63: 2660-2667.

Marafini I, Monteleone I, Di Fusco D, Cupi ML, Paoluzi OA, Colantoni A, et al. TNF- $\alpha$  producing innate lymphoid cells (ILCs) are increased in active celiac disease and contribute to promote intestinal atrophy in mice. *PLoS one.* 2015; 10: e0126291.

Mari A, Ciardiello MA, Tamburrini M, Rasi C, Palazzo P. Proteomic analysis in the identification of allergenic molecules. *Expert Rev. Proteomics.* 2010; 7: 723-734.

Marsh A, Eslick EM, Eslick GD. Does a diet low in FODMAPs reduce symptoms associated with functional gastrointestinal disorders? A comprehensive systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Nutr.* 2015; 55: 897–906.

Mazzarella G, Gianfrani C, Camarca A, Di Stasio L, Rotondi Aufiero V, Giardullo N et al. Extensive in vitro gastrointestinal digestion markedly reduces the immunotoxicity of gliadin from ancient *Triticum monococcum* wheat: implication for celiac disease prevention. *Mol Nutr Food Res.* 2015; 59: 1844-1854.

Melo AD, Silveira H, Bortoluzzi C, Lara LJ, Garbossa CA, Preis G, et al. Intestinal alkaline phosphatase and sodium butyrate may be beneficial in attenuating LPS induced intestinal inflammation. *Genet. Mol. Res.* 2016; 15.

Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3: 36.

Mills EN, Jenkins JA, Alcocer MJ, Sherry PR. Structural, Biological, and Evolutionary Relationships of Plant Food Allergens Sensitizing via the Gastrointestinal Tract. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004; 44: 379-407.

Molina-Infante J, Serra J, Fernandez-Banares F, Mearin F. The low-FODMAP diet for irritable bowel syndrome: Lights and shadows. *Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 39: 55-65.

Molina-Infante J, Carroccio A. Suspected Nonceliac Gluten Sensitivity Confirmed in Few Patients After Gluten Challenge in Double-Blind, Placebo-Controlled Trials. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 15: 339–348.

Molina-Rosell C. Alimentos sin gluten derivados de cereales. En Rodrigo L y Peña AS, ed. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celiaca. Barcelona. España: OmniaScience. 2013; pp. 447-461.

Molnár K, Vannay Á, Sziksz E, Bánki NF, Győrffy H, Arató A. et al. Decreased mucosal expression of intestinal alkaline phosphatase in children with coeliac disease. *Virchows Archiv.* 2012; 460: 157-161.

Monaci L, Visconti A. Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens. *Trends Analyt Chem.* 2009; 28: 581-591.

Morandini P. Inactivation of allergens and toxins. *New Biotech.* 2010; 27: 482-93.

## Bibliografía

Muir JG, Rose R, Rosella O, Liels K, Barrett JS, Shepherd SJ et al. Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by highperformance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 554–565.

Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Roberts G, Muraro A, Sheikh A, et al. Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines Group. Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 2014; 69: 992-1007.

Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y. Double-blind, randomised, placebocontrolled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *Br. J. Nutr.* 2014; 112: 30-40.

Ong SE, Mann M. Mass spectrometry–based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* 2005; 1: 252.

Osborne TB. The proteins of the wheat kernel (No. 84). *Carnegie institution of Washington* 1907.

Ozuna CV, Barro F. Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: An alternative to the gluten free diet with no subchronic adverse effects. *Food Chem. Toxicol.* 2017; 107: 176-185.

Parlato M, Charbit-Henrion F, Pan J, Romano C, Duclaux-Loras R, Le Du MH et al. Human ALPI deficiency causes inflammatory bowel disease and highlights a key mechanism of gut homeostasis. *EMBO Mol Med.* 2018; 10: e8483.

Pastorello EA, Farioli L, Conti A, Pravettoni V, Bonimi S, Lametti S et al. Wheat IgEMediated Food Allergy in European Patines  $\alpha$ -Amylase Inhibitors, Lipid Transfer Proteins and Low-Molecular-Weight Glutenins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2007; 144: 10-22.

Payan F. Structural basis for the inhibición of mammalian and insect  $\alpha$ -amylases by plant protein innhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1696: 171-80.

Pelegrí Calvo C, Soriano Del Castillo JM, Mañes Vinuesa J. Evaluación del estado de salud en celíacos adultos de la Comunidad Valenciana. *Nutr. clín. diet. hosp.* 2013; 33: 43-50.

Pellisé M. Confocal endomicroscopy: should we change our approach to the endoscopic diagnosis of the mucosal lesions of the gastrointestinal tract?.

*Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 33: 267-270.

Peters SL, Biesiekierski JR, Yelland GW, Muir JG, Gibson PR. Randomised clinical trial: gluten may cause depression in subjects with non-coeliac gluten sensitivity—an exploratory clinical study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014; 39: 1104-1112.

Petersen J, Montserrat V, Mujico JR, Loh KL, Beringer DX, van Lummel M, et al. T-cell receptor recognition of HLA-DQ2-gliadin complexes associated with celiac disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014; 21: 480-488.

Pickert G, Becker C, Wirtz S, Heck R, Tottenham L, Zevallos V, et al. Su1895 Nutritional Wheat Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitors Negatively Affect Intestinal Microbiota and Promote Intestinal Inflammation in Mice. *Gastroenterol.* 2016; 150: S582.

Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David CS, et al. The Copolymer P(HEMA-co-SS) Binds Gluten and Reduces Immune Response in GlutenSensitized Mice and Human Tissues. *Gastroenterol.* 2012; 142: 316-325.

Plumb RS, Johnson KA, Rainville P, Smith BW, Wilson ID, Castro-Perez JM. et al. UPLC/MSE; a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. *Rapid. Commun Mass Spectrom.* 2006; 20: 1989-1994.

Porcelli B, Verdino V, Bossini L, Terzuoli L, Fagiolini A. Celiac and non-celiac gluten sensitivity: a review on the association with schizophrenia and mood disorders. *Autoimmun. Highlights* 2014; 5: 55-61.

Pusztai A, Ewen SWB, Grant G, Brown DS, Stewart JC, Peumans WJ, et al. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *Br. J. Nutr.* 1993; 70: 313-321.

Prandi B, Faccini A, Tedeschi T, Galaverna G, Sforza S. LC/MS analysis of proteolytic peptides in wheat extracts for determining the content of the allergen amylase/trypsin inhibitor CM3: Influence of growing area and variety. *Food Chem.* 2013; 140: 141-146.

## Bibliografía

Puccetti A, Saverino D, Opri R, Gabrielli O, Zanoni G, Pelosi A, et al. Immune Response to Rotavirus and Gluten Sensitivity. *J. Immunol Res.* 2018; 2018: 1-26.

Ramón D. Diseño científico de un producto lácteo para celíacos. En Rodrigo L y Peña AS, editores. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 497-506.

Rees D, Holtrop G, Chope G, Moar KM, Cruickshank M, Hoggard N. A randomized, double-blind, cross-over trial to evaluate bread, in which gluten has been predigested by propyl endoprotease treatment, in subjects self-reporting benefits of adopting a gluten-free or low-gluten diet. *Br. J. Nutr.* 2018; 119: 496-506.

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) No 828/2014 DE LA COMISIÓN de 30 de julio de 2014 relativo a los requisitos para la transmisión de información a los consumidores sobre la ausencia o la presencia reducida de gluten en los alimentos. DOUE del 31 de julio de 2014. Disponible en: <https://goo.gl/EWmrnU>.

REGLAMENTO (CE) No 41/2009 DE LA COMISIÓN de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten. DOUE del 21 de enero de 2009. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2009/016/L00003-00005.pdf>.

Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. Sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC): manejo nutricional de la enfermedad. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.* 2017; 37: 179-190.

Reig-Otero Y, Mañes J, Manyes L. Amylase–Trypsin Inhibitors in Wheat and Other Cereals as Potential Activators of the Effects of Nonceliac Gluten Sensitivity. *J. Med. Food.* 2018; 21: 207-214.

Reig-Otero Y, Mañes J, Juan-García C, Manyes L. Análisis de los inhibidores de las  $\alpha$ -amilasa y la tripsina contenidos en el trigo y otros cereales: potenciales promotores de la inflamación intestinal. *Rev. Toxicol.* 2018; 35: 45 – 52.

Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and ButyrateProducing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 979.

Rizzello CG, Curiel JA, Nionelli L, Vincentini O, Di Cagno R, Silano M et al. Use of fungal proteases and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten. *Food Microbiol.* 2014; 37: 59-68.



Rodrigo L, Peña AS. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca. 2013. OmniaScience

Rodrigo L, Álvarez N, Fernández-Bustillo E, Salas-Puig J, Huerta M, Hernández-Lahoz C. Efficacy of a Gluten-Free Diet in the Gilles de la Tourette Syndrome: A Pilot Study. *Nutrients*. 2018; 10: 573.

Ross MH, Pawlina W. Histología: Texto y Atlas Color Con Biología Celular y Molecular. 5ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.

Royal Society of Chemistry. ChemSpider. Nombre molécula, CSID=XXX; <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.XXX.htm> (consultada en junio de 2018).

Salcedo G, Quirce S, Diaz-Perales A. Wheat allergens associated with Baker's asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2011; 21: 81-92.

Salden BN, Monserrat V, Troost FJ, Bruins MJ, Edens L, Bartholomé R, et al. Randomised clinical study: Aspergillus Níger-derived enzyme digests gluten in the stomach of healthy volunteers. *Aliment. Pharm. Ther.* 2015; 42: 273-285.

Sánchez D, ŠTĚPÁNOVÁ HONZOVÁ S, Hospodková M, Hoffmanová I, Hábová V, Halada P et al. Occurrence of serum antibodies against wheat alpha-amylase inhibitor 0.19 in celiac disease. *Physiol Res*. 2018; 67.

Sancho AI, Mills ENC. Proteomic approaches for qualitative and quantitative characterisation of food allergens. *gei* 2010; 58: S42-S46.

Sapone A, Lammers KM, Mazzarella G, Mikhailenko I, Carteni M, Casolaro V et al. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy celiac disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010; 152: 75–80.

Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med.* 2011; 9: 2323.

Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* 2012; 10: 13-13.

Sathe SK, Sharma GM. Effects of food processing on food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009; 53: 970-978.

Satoh R, Teshima R, Kitta K, Lang GH, Schegg K, Blumenthal K. et al. Inter-laboratory optimization of protein extraction, separation, and fluorescent detection of endogenous rice allergens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016; 80: 2198-2207.

Schuppan D, Zevallos V. Wheat amylase trypsin inhibitors as nutritional activators of innate immunity. *Dig. Dis.* 2015; 33: 260-263

Schwingshackl L, Hoffmann G. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: a systematic review and meta-analysis of intervention trials. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2014; 24: 929-939.

Scibilia J, Pastorello EA, Zisa G, Ottolenghi A, Bindslev-Jensen C, Pravettoni V, et al. Wheat allergy: a double-blind, placebo-controlled study in adults. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 2006; 117: 433-439.

Shahbazkhani B, Sadeghi A, Malekzadeh R, Khatavi F, Etemadi M, Kalantri E, et al. Non-celiac gluten sensitivity has narrowed the spectrum of irritable bowel syndrome: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Nutrients.* 2015; 7: 4542-4554.

Shepherd S, Gibson P. The Complete Low FODMAP Diet: A Revolutionary Plan for Managing IBS and Other Digestive Disorders. USA: The Experiment, LLC; 2013.

Shepherd SJ, Gibson PR. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *J. Hum. Nutr. Diet* 2013; 26: 349–58.

Shepherd SJ, Lomer MC, Gibson, PR. Short-chain carbohydrates and functional gastrointestinal disorders. *Am. J. Gastroenterol.* 2013; 108: 707–717.

Sherry R, Casey R. Seed proteins. Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999.

Shewry PR. Wheat. *J. Exp. Bot.* 2009; 60: 1537–1553.

Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, et al. Rational Design of Combination Enzyme Therapy for Celiac Sprue. *Chem Biol.* 2006; 13: 649-658.

Silano V, Pocchiari F, Kasarda DD. Physical characterization of alpha-amylase inhibitors from wheat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1973; 317: 139-148

Simonato B, Pasini G, Giannattasio M, Dal Belin Peruffo A, De Lazzari F, Curioni A. Food allergy to wheat products: the effect of bread baking and in vitro digestion on wheat allergic proteins. A study with bread dough, crumb and crust. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 5668–5673.

Simonato B, Pasini G, De Zorzi M, Vegro M, Curioni A. Potential allergens in durum wheat semolina and pasta: fate during cooking and digestion. *Ital. J. Food Sci.* 2004; 16: 151–163.

Sollid LM, Kolberg J, Scott H, Ek J, Fausa O, Brandtzaeg P. Antibodies to wheat germ agglutinin in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 63: 95-100.

Šotkovský P, Sklenář J, Halada P, Cinová J, Šetinová I, Kainarová A et al. A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clin. Exp. Allergy.* 2011; 41: 1031-1043.

Stoven S, Murray JA, Marietta E. Celiac disease-advances in treatment via Gluten modification. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2012; 10: 859-862.

Szebeni B, Veres G, Dezsofi A, Rusai K, Vannay A, Bokodi G, et al. Increased mucosal expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in coeliac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2007; 45: 187-193.

Tanpowpong P, Ingham TR, Lampshire PK, Kirchberg FF, Epton MJ, Crane J, et al. Coeliac disease and gluten avoidance in New Zealand children. *Arch. Dis. Child.* 2012; 97: 12-16.

Teshima R, Nakamura R, Satoh R, Nakamura R. 2D-DIGE analysis of rice proteins from different cultivars. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010; 58: S30-S35.

Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J. Immunol.* 2006; 176: 25122521.

Tilg H, Koch R, Moschen AR. Proinflammatory wheat attacks on the intestine: alphaamylase trypsin inhibitors as new players. *Gastroenterology.* 2013; 144: 1561-1563.

## Bibliografía

Uhde M, Ajamian M, Caio G, De Giorgio R, Indart A, Green PH. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut*. 2016; 65: 1930-1937.

Uhde M, Indart AC, Yu XB, Jang SS, De Giorgio R, Green PHR et al. Markers of noncoeliac wheat sensitivity in patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Gut*. 2018 [Epub ahead of print].

University of Basel. Biozentrum. The Center for Molecular Life Science. Swiss-Model Repository. Nombre molécula CSID=XXX.  
<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/XXX>

Uvackova L, Skultety L, Bekesova S, McClain S, Hajduch M. MSE based multiplex protein analysis quantified important allergenic proteins and detected relevant peptides carrying known epitopes in wheat grain extracts. *J. Proteome Res*. 2013; 12: 4862-4869.

Valerii MC, Ricci C, Spisni E, Di Silvestro R, De Fazio L, Cavazza E et al. Responses of peripheral blood mononucleated cells from non-celiac gluten sensitive patients to various cereal sources. *Food Chem*. 2015; 176: 167-174.

Van Buul VJ, Brouns FJ. Health effects of wheat lectins: A review. *J. Cereal Sci*. 2014; 59: 112-117.

Vaquero L, Comino I, Vivas S, Rodríguez-Martín L, Giménez MJ, Pastor J, Sousa C, Barro F. Tritordeum: a novel cereal for food processing with good acceptability and significant reduction in gluten immunogenic peptides in comparison with wheat. *J. Sci. Food Agric*. 2018; 98: 2201-2209.

Vasil IK. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep*. 2007; 26, 1133-1154.

Verdu EF, Armstrong D, Murray JA. Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the “no man's land” of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104: 1587.

Verhoeckx KC, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, et al. Food processing and allergenicity. *Food Chem. Toxicol*. 2015; 80: 223-240.

Vici G, Belli L, Biondi M, Polzonetti V. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin. Nutr.* 2016; 35: 1236-1241.

Vojdani A, Perlmutter D. Differentiation between Celiac Disease, Nonceliac Gluten Sensitivity, and Their Overlapping with Crohn's Disease: A Case Series. *Case Reports Immunol.* 2013; 2013: 1-9.

Volta U, Tovoli F, Cicola R, Parisi C, Fabbri A, Piscaglia M et al. Serological tests in gluten sensitivity (nonceliac gluten intolerance). *J. Clin. Gastroenterol.* 2012; 46: 680-685.

Volta U, Bardella MT, Calabrò A, Troncone R, Corazza GR. An Italian prospective multicenter survey on patients suspected of having non-celiac gluten sensitivity. *BMC Med.* 2014; 12: 85-85.

Volta U, Caio G, De Giorgio R. Is autoimmunity more predominant in nonceliac wheat sensitivity than celiac disease?. *Gastroenterology.* 2016; 150: 282-282.

Volta U, Pinto-Sanchez MI, Boschetti E, Caio G, De Giorgio R, Verdu EF. Dietary triggers in irritable bowel syndrome: is there a role for gluten?. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2016; 22: 547-557.

Volta U, Caio G, Karunaratne TB, Alaedini A, De Giorgio R. Non-coeliac gluten/wheat sensitivity: advances in knowledge and relevant questions. *Expert. Rev. Gastroenterology. Hepatol.* 2017; 11: 9-18.

Wal JM. Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy* 2003; 58: 727-729.

Wang JR, Yan ZH, Wei YM, Nevo E, Baum BR, Zheng YL. Molecular characterization of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wheat and development of genome allele-specific primers for the genes located on chromosome 3BS and 3DS. *J. Cereal Sci.* 2006; 43: 360-368.

Wang P, Giese RW. Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2017; 1486: 35-41.

Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007; 24: 115-119.

## Bibliografía

Yamamoto, S., Takanohashi, K., Hara, T., Odani, S., Suzuki, A., and Nishiumi, T. Effects of a high-pressure treatment on the wheat alpha-amylase inhibitor and its relationship to elimination of allergenicity. *J. Phys.: Conference Series*. 2010; 215: 012170.

Zanini B, Villanacci V, De Leo L, Lanzini A. Triticum monococcum in patients with celiac disease: a phase II open study on safety of prolonged daily administration. *Eur. J. Nutr.* 2015; 54:1027–1029.

Zanwar VG, Pawar SV, Gambhire PA, Jain SS, Surude RG, Shah VB, et al. Symptomatic improvement with gluten restriction in irritable bowel syndrome: a prospective, randomized, double blinded placebo controlled trial. *Intest. Res.* 2016; 14: 343-350.

Zevallos V, Junker Y, Hebich B, Rüssel N, Schuppan D. Sa1309 Isolation of AlphaAmylase/Trypsin Inhibitors From Various Plants and Their Ability to Activate Innate Immunity in Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2012; 142: S269.

Zevallos V, Weinmann-Menke J, Meineck M, Schuppan D. Tu1419 Dietary Wheat Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitors Promote Disease Progression in Murine Systemic Lupus Erythematosus. *Gastroenterology* 2016; 150: S900.

Zevallos V, Bros M, Montermann E, Schuppan D. Sa1394 wheat alpha-amylase/trypsin inhibitors in commercial gluten as activators of dendritic cells. *Gastroenterology* 2016; 150: S303-S304.

Zevallos V, Herencia I, Schuppan D. Tu1381 Gluten-Free Crops Can Contain Proteins With Innate Immune Stimulatory Capacity: Influence of Environmental Factors. *Gastroenterology* 2016; 150: S890-S890.

Zevallos V, Raker V, Tenzer S, et al. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 2017; 152: 1100-1113.

Zevallos V, Raker VK, Maxeiner J, Scholtes P, Steinbrink K, Schuppan D. Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate murine allergic airway inflammation. *Eur J Nutr.* 2018: 1-8. [Epub ahead of print].

Zoccatelli G, Segà M, Bolla M, Cecconi D, Vaccino P, Rizzi C, Chignola R, Brandolini A. Expression of  $\alpha$ -amylase inhibitors in diploid Triticum species. *Food Chem.* 2012; 135: 2643-2649.