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

Reig-Otero Y.[1], Mañes J. [1], Juan-García, C. [1], Manyes L. [1*]

[1] *Departamento de Medicina Preventiva i Salud 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 α-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 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 (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 α-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 α-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 α-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 α-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).

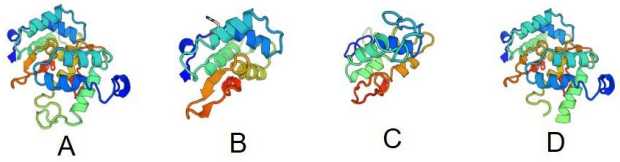

Figura 1: Representación de las estructuras 3D de varios inhibidores de la familia de los cereales: Inhibidor de la amilasa y la tripsina del trigo A) 0.53 B) 0.28 C) CM3 D) 0.19. Fuente: Swiss-Model Repository https://swissmodel.expasy.org/repository.

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

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.

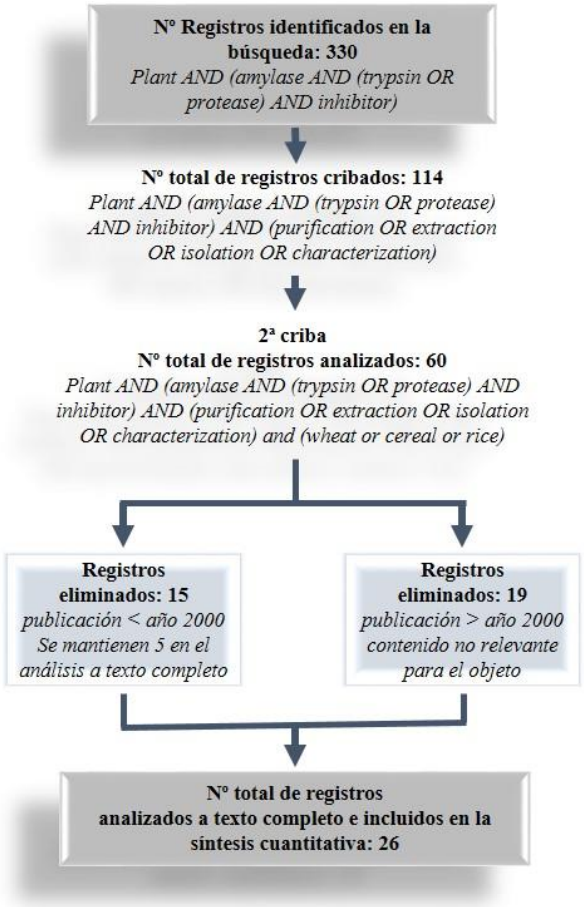

Figura 2: Diagrama de flujo y criterios de búsqueda utilizados para la revisión sistemática.

Resultados

Existen dos técnicas para detectar y cuantificar las proteínas con propiedades alergénicas en alimentos: MS y enzimoinmunoensayos. 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).

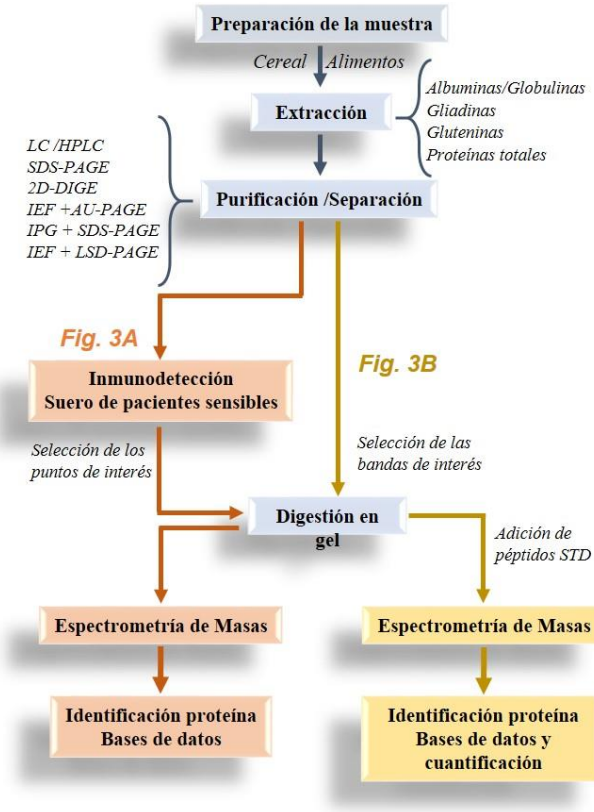

Figura 3: Estrategias de análisis utilizadas para la identificación y cuantificación de los ATIs en cereales

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.

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 *Triticum aestivum*	NH_4HCO_3 50 mM pH 7.8 y precipitación con $(NH_4)_2SO_4$.	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 *Triticum durum* y 50% trigo *Triticum aestivum* Muestra cruda y muestra cocida	*albuminas/globulinas:* 0.5 M NaCl, pH 8.5 en 0.05 M Tris-HCl *Gliadinas:* 70% (v/v) etanol *Gluteninas:* 2.5 ml of Tris-SO_4, pH 6.1, 10% (p/v) SDS, 2-mercaptoetanol y 50% (v/v) glicerol.	SDS-PAGE	MALDI-TOF ESI-MS/MS	*Albuminas/Globulinas:* CM1, 0.19, CM3, CM6 *Gliadinas:* CM2, CM16, 0,19 *Gluteninas:* CM2, CM3, CM16	(Pastorello et al., 2007)
Trigo *Triticum aestivum* cultivars Norin No. 61, Kitanokaori y Haruyokoi,	*Proteínas totales:* 8M urea, 40 mM Tris, and 4% CHAPS *Albuminas/Globulinas:* 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.8) *Gliadinas:* 75% etanol *Gluteninas:* 50 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1% SDS y 0.5% DTT	IEF X LDS-PAGE	MALTI TOF/TOF	0.28, WDAI	(Akagawa et al., 2007)
Trigo *Tritium aestivum*	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 et al., 2011)
Trigo *Triticum turgidum spp. durum*	Solución 0.5 M NaCl	SDS–PAGE	HPLC-LTQORBITRAP HPLC/ESI-MS/MS UPCL/ESI-MS	CM3	(Flodrová et al., 2015)
Trigo Emmer o farro *Triticum dicoccon* Schrank	Solución: 0.15 M NaCl y precipitado con $(NH_4)_2SO_4$	RP-HPLC SDS-PAGE	MALDI-TOF RP-HPCL/nESI-MS/MS	EDI-1, EDI-2	(Fontanini et al., 2007)
Trigo *Triticum aestivum* cultivar Viginta	*Gliadinas:* 1 mL de 50% (v/v) isopropanol *Gluteninas:* 1 mL de 50% (v/v) isopropanol, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) conteniendo 1% (p/v) DTT		UPLC-QTOF-MS^E	*Gliadinas:* CM16 (1.5 ng/µg) CM2 (3.4 ng/µg) *Gluteninas:* CM17 (6.8 ng/µg), CM1 (1.5 ng/µg), CM16 (1.7 ng/µg)	(Uvackova et al., 2013)
Trigo Triticum turgidum L. subsp. durum	Isopropanol (1:5 p/v)	IMAC (Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados)	HPLC	CM3	(Cuccioloni et al., 2016)
Harina de trigo *Triticum aestivum* cultivar Hokushin	8 M urea, 2% (v/v) Triton X-100, 0,001% Bromofenol azul (BPB)	IPG X AU-PAGE	MALDI-TOF		(Kitta et al., 2006)
Muestra de pasta comercial de trigo *Triticum durum* Muestra cruda y muestra cocida	*Proteínas totales:* 7 M urea, 80 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 *albuminas/globulinas:* 0.4 M NaCl, 0.067 M $HKNaPO_4$, pH 4.6.	SDS-PAGE	LC-ESI MS/MS	CM3, CM16, CM2	(Mamone et al., 2015)
Trigo *Triticum aestivum* L., cultivar Saratovskaya	Solución acetato 0.1 M y precipitado con $(NH_4)_2SO_4$	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 (Oryza sativa cv.)	*Proteínas solubles en sales:* 30mM Tris–HCl pH 8.0/pH 6.8 y 1M NaCl *Insolubles:* 55-mM Tris–HCl (pH 6.8), 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol y 11 mg/mL de DTT *Proteínas totales:* 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	SDS–PAGE	MALDI-TOF	No se detallan en la publicación	(Lang et al., 2013)
Arroz crudo y cocido (*Oryza sativa L.*)	Dos soluciones: PBS – Tampón fosfato sódico: 0.9% NaCl, 0.02% NaH_2PO_4 y 0.05% Na_2HPO_4, pH 7.2 SDS – Tamoón dodecilsulfato sódico: 1% SDS, 10% glicerina, 5% 2-mercaptoetanol, y TRIS 50 mM	SDS-PAGE	MALDI-TOF/TOF - LIFT	RA5, RAG2, RAG1	(Goliáš et al., 2013)
Arroz, dos variedades japonesas (*Oryza sativa cv.* Nipponbare y Koshihikari), un arroz indio (Kasalath),y un arroz tailandés (Bleiyo)	*Soluciones salinas:* solución I, 1M NaCl; solución II, 0.5M NaCl en 30mM Tris–HCl (pH 6.8) *Kit comercial* P-PER (Thermo Fisher Scientific,) *Solución de urea:* 8 M Urea, 4% CHAPS, 60 mM DTT	SDS-PAGE 2D-DIGE		RAG1, RAG2, RAG3, RAG4 y RAG5	(Satoh et al., 2016)
Arroz (*Oryza sativa* L. var. *japponica cv Nipponbare)*	Precipitación con $(NH_4)_2SO_4$	IC - HPLC	JOEL JLC-300	RA17	(Izumi et al., 1999)

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

Muestra	Método de extracción	Purificación y separación	Identificación	Inhibidores identificados	Ref.
Avena (*Avena sativa)*	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 et al., 2016)
Centeno (*Secale cereale*).	70% solución etanol (v/v) y precipitación $(NH_4)_2SO_4$	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 et al., 2000)
Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)	NaH_2PO_4 20 mM pH 6.9	N-LP-IEF SDS-PAGE	MALDI -TOF	CcdAI	(Gadge et al., 2015)
Ragi (*Eleusine coracana* Gaertn.)	0.15 M NaCl	Columna Trypsin-Sepharosa FPLC	MALDI-TOF-TOF-MS/MS	PKI RBI PKII	(Sen y Dutta, 2016)

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 NH_4HCO_3 50mM sobre muestras de varios cereales y alimentos procesados y sin procesar. Tres extracciones consecutivas seguidas de la precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ 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 electroisoenfoque 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 (Satoh 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 pI 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^E) 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 alérgenas 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

1. *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.
2. *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.
3. *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.
4. *Bowman DE*. Differentiation of soy bean antitryptic factors. Proc Soc Exp Biol Med. 1946; 63(3), 547-550.
5. *Breiteneder H., Mills EN*. Molecular properties of food allergens. J. Allergy Clin Immunol. 2005; 115(1), 14-23.
6. *Carbonero Z, García P, Olmedo F*. A multigene family of trypsin/α-amylase inhibitors from cereals. In: Sherry R, Casey R, editors. Seed proteins, Netherland: Springer Science+Business Media, B.V.; 1999, p. 617-633.
7. *Croote D, Quake SR*. Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology. NPJ Syst Biol Appl. 2016; 2, 16022.
8. *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.
9. *Dang L, Van Damme EJ*. Toxic proteins in plants. Phytochem. 2015; 117, 51-64.
10. *Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C.* Current trends in quantitative proteomics. J Mass Spectrom. 2009; 44(12), 1637-1660.
11. *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.
12. *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.
13. *Fontanini D, Capocchi A, Muccilli V, Saviozzi F, Cunsolo V, Saletti R. et al*. Dimeric inhibitors of human salivary α-amylase from emmer (Triticum dicoccon Schrank) seeds. J Agric Food Chem. 2007; 55(25), 10452-10460.
14. *Franco O, Rigden D, Melo F, Grossi-de-Sá M*. Plant α-amylase inhibitors and their interaction with insect α-amylases. Eur J Biochem. 2002; 269(2), 397-412.
15. *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.
16. *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.
17. *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.
18. *Han X, Aslanian A, Yates JR.* Mass spectrometry for proteomics. Curr Opin Chem Biol. 2008; 12(5), 483-490.
19. *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.
20. *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.
21. *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.
22. *Islamov RA., Fursov OV*. Bifunctional inhibitor of α-amylase/trypsin from wheat grain. Prikl Biokhim Mikrobiol. 2007; 43(4), 419-423.
23. *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 α-amylase inhibitor from Secale cereale (rye). Int J Biochem Cell Biol. 2000; 32(11), 1195-1204.
24. *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 a-amylase inhibitor from Secale cereale (rye). Int. J. Biochem. Cell Biol. 2000; 1195–1204.
25. *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.
26. *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.

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

28. *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.

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

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

31. *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.

32. *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.

33. 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.

34. *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.

35. *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.

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(5), 379-407.

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

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

39. *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.

40. *Payan F.* Structural basis for the inhibición of mammalian and insect α-amylases by plant protein innhibitors. Biochim Biophys Acta. 2004; 1696(2), 171-80.

41. *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(13), 1989-1994.

42. *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.

43. *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.

44. *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.

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

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

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

48. *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.

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

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

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

52. *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.

53. *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(11), 4862-4869.

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

55. *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.

56. *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.

57. *Zevallos V, Herencia I, Schuppan D. Tu*1381 Gluten-Free Crops Can Contain Proteins With Innate Immune Stimulatory Capacity: Influence of Environmental Factors. Gastroenterology. 2016; 150(4), S890.

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