

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M^a Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-003

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 17 de febrero de 2010

Grupo de Trabajo

Manuel Martín Esteban (Coordinador)
Juan Francisco Cacho Palomar
Alberto Cepeda Sáez
Francisco Martín Bermudo
Isabel Prieto Santos (CNA-AESAN)

63

revista del comité científico n.º 12

Resumen

La enfermedad celíaca, requiere una dieta exenta de gluten. Con el fin de conocer las cantidades de gluten que contienen los productos alimenticios destinados a los celíacos, el Reglamento (CE) N.º 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, estableció que los productos alimenticios para personas con intolerancia al gluten, pueden llevar el término "exento de gluten", si el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total y el término "contenido muy reducido en gluten", si el contenido de gluten no supera los 100 mg/kg en total, medidos ambos en los alimentos tal y como se venden al consumidor final. Este Reglamento será aplicable a partir del 1 de enero de 2012.

Resulta necesario disponer de técnicas analíticas cuya sensibilidad y especificidad, aseguren de manera fiable los contenidos de gluten establecidos.

Entre los métodos disponibles actualmente, los inmunológicos son los métodos de elección para la detección de gluten en alimentos. Existen además otros métodos de confirmación como la detección de proteínas por métodos no inmunológicos o la detección de ADN de cereales alergénicos.

Debido a que aún quedan problemas sin resolver en la determinación del contenido en gluten, este Comité considera necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías, buscando aumentar la sensibilidad y especificidad de los métodos existentes.

Palabras clave

Enfermedad celíaca, celíaco, alimentos, gluten, técnicas y métodos analíticos.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) with regard to coeliac disease and the problems posed by the analytical techniques for the control of gluten contents in food.

Abstract

Coeliac disease requires a gluten-free diet. In order to know the amounts of gluten contained in foodstuffs intended for people with celiac disease, the European Commission's (EC) Regulation N° 41/2009 dated January 20th, 2009, concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten, established that the food products for people with gluten intolerance may use the term "gluten-free" if the gluten content does not exceed 20 mg/kg in total and the term "very low gluten content" if the gluten content does not exceed 100 mg/kg in total, both measured in the foodstuff as sold to the final consumer. This Regulation will come into force on January 1st, 2012.

It is necessary to have available analytical techniques with sufficient sensitivity and specificity to ensure the reliability of the gluten contents established.

Among the methods currently available, immunological methods are the first choice for the detection of gluten in foodstuffs. In addition, there are other confirmatory methods such as the detection of proteins by non-immunological methods or the detection of the DNA of allergenic cereals.

Since there are still unresolved problems in the determination of gluten contents, this Committee considers it is necessary to continue working on the development of new technologies, seeking to increase the sensitivity and specificity of the existing methods.

Key words

Coeliac disease, celiac, foodstuffs, gluten, analytical techniques and methods.

Introducción

Ante el problema que representa una dieta de eliminación correcta en la enfermedad celíaca, el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2005) redactó un breve documento de opinión con la conclusión de que no se disponía de datos suficientes que permitieran establecer un umbral de seguridad, en relación con la ingesta de gluten, válido para todos los celíacos. Ante esa situación, el Comité Científico recomendaba, entre otros aspectos, la necesidad de incluir las cantidades de gluten que contienen los alimentos en la información nutricional de los productos manufacturados destinados a pacientes celíacos, así como la utilización de métodos precisos y fiables, con suficiente sensibilidad, y especificidad para la determinación de gluten en los alimentos.

Posteriormente, un documento de la Unión Europea aconseja, en base a los conocimientos actuales, un contenido máximo de 20 mg de gluten por kg de producto final, en los llamados "alimentos exentos de gluten" como un valor que puede ser suficientemente seguro para la mayoría de los pacientes celíacos (UE, 2009). Sin embargo, con el progreso de los conocimientos sobre esta enfermedad, es posible que esta recomendación cambie.

Si ya es problemático realizar un tratamiento correcto, suficientemente seguro, de la enfermedad celíaca, las dificultades aumentan si no se dispone de instrumentos adecuados para medir esas cantidades de gluten permitidas. Por lo tanto, parece justificada la necesidad de disponer de métodos suficientemente validados que permitan una cuantificación fiable de gluten en los alimentos, así como que su límite de detección sea lo suficientemente bajo para su aplicación en caso de variación de las cifras umbral consideradas seguras.

En este documento se revisa la situación actual del tratamiento de la enfermedad celíaca, de la necesidad de una dieta correcta y del nivel umbral aceptable de contenido en gluten en los alimentos. En base a ello, se hace un estudio crítico de los métodos disponibles actualmente para la cuantificación de gluten en alimentos, subrayando sus ventajas e inconvenientes.

El problema de la enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca es un proceso inflamatorio intestinal producido por una respuesta inmune anómala, de carácter permanente, a proteínas (prolaminas) del gluten de la dieta, en sujetos susceptibles genéticamente (Koning et al., 2005). Con una prevalencia aproximada de 1 por 100-200, la enfermedad celíaca es la enteropatía inducida por alimentos más frecuente en el mundo occidental (Rostom et al., 2006). En España este valor oscila, en el niño, entre 1/100 y 1/70 (Polanco, 2008) y sobre 1/350 en el adulto (Casellas, 2006). Estas cifras pueden ser, incluso, más elevadas, teniendo en cuenta que hay muchos pacientes, con formas silentes o asintomáticas, no diagnosticados.

Se trata de una enfermedad multifactorial (factores genéticos, ambientales e inmunológicos) con una fuerte asociación HLA (Kagnoff, 2007). La enfermedad celíaca es una de las enfermedades de base genética más frecuente (Green y Jabri, 2003). Aproximadamente el 95% de los pacientes celíacos son HLA-DQ2 y el resto es habitualmente HLA-DQ8. Se necesita la presencia de estos haplotipos para el desarrollo de la enfermedad y su ausencia prácticamente excluye el diagnóstico (Green et al., 2001). Sin embargo, hasta un 45% de la población general tiene estos haplotipos HLA (NIH, 2005).

Su base es una enteropatía autoinmune, asociada con diversos grados de malabsorción, y afectación multisistémica. Sus síntomas y signos son muy variables (Green y Cellier, 2007), por lo que no son buenos

indicadores de enfermedad activa. La manifestación más típica de la enfermedad celíaca es la diarrea crónica con pérdida de peso, pero una gran proporción de pacientes tienen signos extradigestivos, como retraso del crecimiento, anemia, lesiones cutáneas (dermatitis herpetiforme), hipertransaminasemia aislada, osteopenia, infertilidad, ataxia o polineuropatía, etc. (NIH, 2005). Además, muchos pacientes tienen solo síntomas leves o, incluso, inaparentes, por lo que son difíciles de diagnosticar correctamente. El indicador definitivo de la lesión producida por el gluten es la histopatología de la mucosa del intestino delgado (Catassi et al., 2007).

El gluten

El gluten constituye las proteínas de reserva, insolubles en agua o sales, del trigo y otros cereales, denominadas, en el caso del trigo, gliadina y glutenina, ambas involucradas en la enfermedad celíaca. Estas proteínas tienen un elevado contenido de prolina (Shewry, 1995), por lo que se conocen, en conjunto, como prolaminas y se identifican habitualmente con técnicas electroforéticas.

El término gluten es científicamente impreciso y su definición varía, incluso cuando se aplica a alimentos exentos de gluten. Actualmente, el *Codex Alimentarius* define al gluten como "una fracción proteica del trigo, centeno, cebada, avena, de sus variedades híbridas y sus derivados, al que algunas personas son intolerantes, y que es insoluble en agua y en ClNa 0,5 M" (CODEX, 2008) (Tabla 1).

Tabla 1. Fracciones proteicas de los granos de cereales (fracciones de Osborne)

Fracción	Trigo	Centeno	Cebada	Avena	Maíz	
Globulina	Edestina					
Albúmina	Leucosina					
Gluten	Prolamina	Gliadina	Secalina	Hordeína	Avenina	Zeina
	Glutelina	Glutenina	Secalinina	Hordenina	Avenalina	Zeanina

Existen al menos cuatro clases de gliadinas monoméricas: α , β , γ y ω -gliadina. La identificación de cuál es la secuencia responsable de la acción nociva de las distintas prolaminas es uno de los mayores retos, y siguen haciéndose esfuerzos para obtener una información precisa al respecto.

Debido a su alto contenido en prolina, las proteínas del gluten se degradan con gran dificultad por las enzimas del tracto gastrointestinal (Shan et al., 2002). En el intestino delgado de los celíacos las proteínas del gluten, parcialmente degradadas, son modificadas por la actividad de la enzima transglutaminasa tisular (TGt) (Arentz-Hansen et al., 2000). En las proteínas del gluten se han identificado al menos 50 epítomos estimuladores de células T, de los que un péptido 33-mer de la α -gliadina parece ser el más inmunógeno (Shan et al., 2002). Este péptido contiene seis epítomos parcialmente superpuestos y es resistente a la degradación por las enzimas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo de la mucosa intestinal.

Tratamiento de la enfermedad celíaca

En la actualidad, el único tratamiento posible de la enfermedad celíaca es una alimentación rigurosamente exenta de gluten por toda la vida. Incluso pequeñas cantidades pueden ser nocivas. Esta dieta, aunque realizable, es muy complicada, debido al amplio uso en la industria alimentaria de cereales que contienen gluten y también como componente de diversos productos que habitualmente no se

asocian con gluten o trigo, como los medicamentos. Además, la dieta sin gluten implica importantes restricciones en la vida social del celíaco (Mearin, 2007).

En la mayoría de los celíacos la eliminación del gluten de la dieta conduce a una desaparición de los síntomas clínicos, normalización de los marcadores serológicos y recuperación de las lesiones de la mucosa duodenoyeyunal, así como la prevención de las complicaciones de la enfermedad celíaca, como el cáncer gastrointestinal (Fasano y Catassi, 2001). Su reintroducción en cualquier momento de la evolución causa reactivación de los síntomas, reaparición de la lesión intestinal y aumento de los niveles de anticuerpos anti-TGt tisular y antigliadina. La comprobación de esta respuesta es necesaria para un diagnóstico seguro de enfermedad celíaca.

En esta dieta están implicados los cereales con gluten, trigo, centeno, cebada, variedades híbridas y derivados. Diversos estudios clínicos indican que la avena es tolerada por gran parte de celíacos y puede mejorar y ampliar el contenido de la dieta y, sobre todo, la calidad de vida de los pacientes (Peraaho et al., 2004). Dado que desde el punto de vista molecular existen diferencias significativas entre las aveninas y las prolaminas de trigo, cebada y centeno, se postuló que las aveninas no estarían involucradas en la patología. En algunos países donde el consumo de avena es importante, la comprobación de su inocuidad permitiría incluirla libremente en la dieta sin gluten. Algunos estudios en los que se ha incluido un elevado número de celíacos describen que la avena sería tolerada (Janatuinen et al., 2002). Sin embargo, otros trabajos (Lundin et al., 2003) muestran que en la provocación con avena ciertos pacientes desarrollan las alteraciones histológicas típicas, con presencia de linfocitos T específicos para aveninas en la lamina propia. Por otra parte, desde un punto de vista práctico existen innumerables ocasiones en las que puede ocurrir contaminación con prolaminas nocivas (cultivo mixto en los campos, almacenamiento, molienda o transporte donde normalmente se almacena, muele o transporta trigo, etc.) (Thompson, 2003). Por esta razón, particularmente en países donde mayoritariamente se produce y consume trigo, se considera que los productos a base de avena no son inocuos o naturalmente no nocivos y deben ser analizados.

Dieta exenta de gluten. El nivel umbral

Los celíacos requieren una estricta dieta libre de gluten que sólo es posible si los productos que consumen son correctamente evaluados en cuanto a su contenido de prolaminas.

Sin embargo, dado que no existe un modelo animal adecuado de la enfermedad, y que las pruebas *in vivo* y *ex vivo* presentan una gran variabilidad, ha resultado difícil establecer con certeza la cantidad máxima de prolaminas nocivas tolerada por un enfermo celíaco. Por razones éticas los estudios hechos se han realizado en grupos pequeños de pacientes y controles, sin poder establecer conclusiones definitivas (Hischenhuber et al., 2006).

Por supuesto, una dieta completamente exenta de gluten sería lo ideal, pero, por ahora, es algo inalcanzable. Incluso los productos naturalmente libres de gluten pueden contener cantidades significativas (Collin et al., 2004). Además, unos límites demasiado rigurosos podrían ocasionar una disponibilidad muy reducida de productos sin gluten, lo que dificultaría aún más el cumplimiento de la dieta. Por otro lado, la sensibilidad al gluten es variable en cada celíaco (Collin et al., 2007), lo que complica más aún la elección de unos límites aceptables de trazas de gluten en los alimentos sin gluten.

Está aceptado que la prueba de provocación con gluten es el patrón-oro para la comprobación del nivel de tolerancia al gluten. En un estudio reciente (Catassi et al., 2007) en doble ciego controlado con placebo, realizado para establecer un umbral seguro de gluten en pacientes con enfermedad celíaca, se ha observado que la mayoría de los celíacos deben ingerir menos de 50 mg al día. No obstante, hay que interpretar estos resultados con precaución, debido al limitado número de pacientes investigados (20 pacientes) y a la corta duración de la provocación (tres meses). Además, esta dosis diaria umbral debe relacionarse con la ingesta real, donde la cantidad ingerida depende de la concentración de prolaminas en cada producto y de la cantidad que se ingiere de cada alimento. Es posible realizar estimaciones basadas en encuestas de hábitos nutricionales y establecer un valor de referencia para redefinir los límites del contenido de gliadinas de los productos libres de gluten. Las estimaciones realizadas sugieren que el valor de 20 partes por millón (ppm)¹ de gluten es un valor suficientemente seguro para la mayoría de los pacientes celíacos. Sin embargo, se considera si es necesario sugerir un valor más bajo para incrementar la seguridad en la dieta ya que puede haber errores involuntarios en la ingesta y la presencia de individuos con una mayor sensibilidad al gluten.

Alimentos exentos de gluten. Normativa

La mayor parte de los países europeos han aceptado la definición de "exento de gluten" del *Codex Alimentarius* (CODEX, 2008) que establece el contenido de gluten en los productos libres de gluten. Propuso inicialmente el uso de dos límites para la identificación de productos para consumo por pacientes celíacos: 20 ppm de gluten para productos naturalmente libres de gluten y 200 ppm de gluten para productos manufacturados como libres de gluten. Como las gliadinas representan, aproximadamente el 50% del gluten, también puede decirse que los alimentos aptos para el consumo por los celíacos no deben contener más de 10 ppm de gliadinas.

Estos límites están en permanente revisión, y en la propuesta vigente de la Comisión del *Codex Alimentarius* se establecen dos niveles (CODEX, 2008):

1. Alimentos exentos de gluten.

- a) están constituidos por, o son elaborados con, uno o más ingredientes que no contienen trigo (es decir todas las especies de *Triticum*, como trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, y cuyo contenido en gluten no sobrepase los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor; o
- b) están constituidos por uno o más ingredientes procedentes del trigo (es decir todas las especies de *Triticum*, como trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, que han sido procesados de forma especial para eliminar el gluten y cuyo contenido en gluten no sobrepase los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

2. Alimentos procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg. Estos alimentos están constituidos por uno o más

¹Una parte por millón (ppm) equivale a 1mg/kg.

ingredientes procedentes del trigo (es decir todas las especies de *Triticum*, como trigo duro, la espelta y el kamut), centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas que han sido procesados de forma especial para reducir el contenido de gluten a un nivel comprendido entre 20 mg/kg y 100 mg/kg en total medido en los alimentos tal como se venden o distribuyen al consumidor.

Estos valores han sido adoptados por la Comisión de las Comunidades Europeas (UE, 2009) que serán aplicables a partir de enero de 2012. En este Reglamento se establecen como alimentos que pueden llevar en el etiquetado el término "exentos de gluten", aquellos en los cuales el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg y con la mención "contenido muy reducido de gluten" aquellos alimentos que han sido tratados de forma especial para eliminar el gluten cuando no contengan un nivel que supere los 100 mg/kg.

Métodos de detección de gluten en alimentos

Los métodos disponibles actualmente para la determinación del contenido de gluten en alimentos pueden clasificarse así:

1. Métodos de análisis basados en la detección de proteínas

El principal objetivo de los métodos de detección de gluten en alimentos destinados al consumo por pacientes celíacos, es la detección de las proteínas alergénicas en los alimentos elaborados a partir de cereales que contiene prolaminas nocivas.

La detección de proteínas puede realizarse de forma fácil y fiable en muestras de alimentos frescos o procesados, siempre y cuando el procesamiento no haya afectado a dichas proteínas. Además, es necesario disponer de muestras con un contenido proteico en cantidad suficiente.

Técnicas inmunológicas

Una de las herramientas más eficaces, es el desarrollo de metodologías basadas en técnicas inmunológicas, con la utilización de anticuerpos específicos frente a las fracciones nocivas del gluten.

La obtención de estos anticuerpos con suficiente calidad y especificidad es uno de los principales retos en el desarrollo de los métodos inmunológicos de detección de gluten, debido, principalmente, a que no están claramente identificadas la fracción o fracciones nocivas del gluten. En consecuencia, es posible que un elevado número de péptidos derivados de α , β , γ y ω -gliadinas y, como se ha comprobado recientemente, de las gluteninas del gluten, puedan estar implicados en el desencadenamiento de la enfermedad celíaca.

Los primeros métodos inmunológicos de detección de gluten se desarrollaron en base a la obtención de anticuerpos policlonales frente al conjunto de prolaminas del trigo. En 1991, Skerritt y Hill desarrollan el primer método basado en la obtención de un anticuerpo monoclonal frente a la fracción más termorresistente de las gliadinas (ω -gliadinas). El método fue considerado como primer método oficial de la AOAC. Posteriormente se comprobó que el método presentaba una menor sensibilidad en comparación con nuevos métodos diseñados frente a otras fracciones nocivas debido a que, las ω -gliadinas constituyen la fracción minoritaria de las prolaminas del gluten, lo que ha llevado a que este momento el método se encuentre en desuso.

En la actualidad, los métodos con mayor aceptación son los basados en la utilización del anticuerpo monoclonal R5 obtenido frente al pentapéptido (QQFPF) potencialmente nocivo que se encuentra repetidamente en las subfracciones α , β , γ y ω -gliadinas, así como en secalinas y hordeínas. Este anticuerpo ha servido como base para el desarrollo de los métodos ELISA más utilizados actualmente (Valdés et al., 2003).

No obstante, estudios científicos recientes, también implican a las gluteninas en la responsabilidad de desencadenar la respuesta anómala al gluten (Dewar et al., 2006) (Howdle, 2006). Los estudios de estas investigaciones parecen indicar que péptidos derivados de ambos grupos, gliadinas y gluteninas, son inmunostimuladores en la enfermedad celiaca y que existe una alta probabilidad de que las gluteninas sean también nocivas. En consecuencia, se están desarrollando métodos analíticos que sean capaces de detectar tanto las gliadinas como las gluteninas.

Además, el desarrollo de anticuerpos para la detección de gluten en alimentos plantea la dificultad de que las proteínas pierden su estructura terciaria cuando se desnaturalizan debido a cambios de presión, temperatura, concentración de sales o procesos de hidrólisis enzimática o química a los que pueden ser sometidas durante el procesado o elaboración de alimentos.

Dentro de los métodos inmunológicos se incluyen:

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* o ensayo ligado a enzima, enzimoimmunoanálisis)

La técnica ELISA es un método inmunológico clásico y quizá uno de los más utilizados. Los métodos ELISA son adecuados para análisis rutinarios a gran escala, ya que se realizan con rapidez y proporcionan una alta sensibilidad siempre y cuando, como se ha mencionado anteriormente, las proteínas no se encuentren desnaturalizadas y se disponga del anticuerpo adecuado.

Como inconvenientes en la utilización de las técnicas ELISA hay que considerar la posible aparición de falsos negativos, como consecuencia de la incapacidad de los anticuerpos para reconocer las proteínas alteradas durante el procesado en algunos alimentos. También hay la posibilidad de que se produzcan reacciones cruzadas entre especies estrechamente relacionadas, dando lugar a la aparición de falsos positivos. A pesar de esto, por el momento podemos considerar los métodos ELISA como la herramienta clave para la determinación de gluten en alimentos.

Los métodos ELISA diseñados mediante un sistema de doble anticuerpo (ELI tipo sándwich), utilizando el anticuerpo monoclonal R5, citado anteriormente (Valdés et al., 2003) (Méndez et al., 2005), son los más utilizados actualmente para el análisis cuantitativo de gliadina de trigo y las prolaminas correspondientes de centeno y cebada en alimentos. Están considerados método de análisis Tipo I por el *Codex Alimentarius* (CODEX, 2008) para la determinación de gluten en alimentos y son los métodos recomendados por el *Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity* (WGPAT).

El anticuerpo monoclonal R5 reconoce el epitopo QQFPF considerado como tóxico y un péptido de 33-mer que se encuentra repetidas veces en las fracciones α , β , γ y ω de las prolaminas y que responde por igual frente a las prolaminas de trigo, cebada y centeno. Sin embargo, el anticuerpo R5 no reconoce las posibles fracciones tóxicas de la avena.

Mediante los métodos ELISA utilizando el anticuerpo R5 es posible alcanzar límites de cuantificación de gluten en alimentos de 5 ppm (5 mg/kg) (Tabla 2).

Tabla 2. Límites de detección de los métodos inmunológicos de gluten*

Métodos de detección de gluten	Límite de detección	Límite de cuantificación (ppm de gluten)
ELISA Sándwich anticuerpo R5	3 ppm	5 ppm
Otros ELISA Sándwich con otros anticuerpos		3-10 ppm
Tiras Inmuncromatográficas	2-4 ppm	
Western Blot		8 ppm

*Datos del Centro Nacional de Alimentación (AESAN).

Existen en el mercado otros sistemas ELISA tipo sándwich desarrollados para la detección de gluten en alimentos que utilizan anticuerpos monoclonales y/o policlonales diferentes al R5 y que igualmente son capaces de detectar fracciones nocivas del gluten. Los límites de cuantificación declarados por estos sistemas se encuentran entre 3 y 10 ppm de gluten (3 y 10 mg/kg).

Los sistemas descritos, ELISA tipo sandwich, declaran su aplicabilidad a la detección de gluten en todo tipo de alimentos crudos y procesados excepto en alimentos hidrolizados, y/o altamente procesados como, almidones, bebidas alcohólicas, siropes, etc. en los que el gluten debido a tratamientos térmicos o enzimáticos como parte del proceso de elaboración del alimento, se encuentra fragmentado en fracciones incapaces de ser reconocidas por los anticuerpos. Esta fragmentación puede originar pequeños péptidos que no son reconocidos por los anticuerpos y sin embargo pueden contener secuencias de los epitopos nocivos para los enfermos celíacos.

Este problema se ha intentado solucionar mediante el desarrollo de sistemas "ELISA competitivos". Estos sistemas requieren un único epitopo activo para reaccionar con el anticuerpo frente a los ELISA tipo sándwich que necesitan más de un epitopo activo para poder construir, el complejo sándwich (anticuerpo-antígeno-anticuerpo) fundamento del método.

Los sistemas ELISA competitivos relacionan el contenido total de gluten en alimentos con la cantidad de posible péptido tóxico, expresando el resultado en forma de $\mu\text{g/g}$ de péptido equivalente. El problema es que, hasta el momento, no se ha podido establecer una forma clara de relación entre la cantidad de péptido cuantificado y la cantidad total de gluten en alimento. En estudios presentados en la 22ª Reunión de WGPAT se muestra que debido al desconocimiento de cómo se produce la fragmentación de las gliadinas en péptidos más pequeños y que ésta puede variar de muestra a muestra, es difícil establecer un factor real de conversión de péptidos en gliadinas (Janssen et al., 2007) (Immer et al., 2007).

Tiras inmuncromatográficas

Algunas casas comerciales han desarrollado métodos inmuncromatográficos o de detección de Flujo Laminar (LFS) para la búsqueda de gluten en alimentos. Estos sistemas utilizan dos anticuerpos inmovilizados en membrana formando líneas separadas a través de ella. Un anticuerpo es específico frente a las proteínas alergénicas de gluten y el otro sirve como control del sistema.

La utilización de tiras inmuncromatográficas, sistema de sencillo manejo y muy rápido, únicamente debe ser tenida en cuenta como método cualitativo de detección y no como sistema cuantitativo, debido a que muestra poca precisión, y sólo puede servir para dar una información orientativa del contenido de gluten.

Otra de las limitaciones de estos sistemas es el tipo de productos sobre los que pueden ser aplicados, debido a que algunos alimentos por su composición o tratamiento pueden presentar algún tipo de interferencia. Estos métodos pueden ser considerados de utilidad como sistemas de *screening* sobre materias crudas y productos poco procesados.

Al igual que sucede con los sistemas ELISA, podemos encontrar en el mercado diferentes sistemas inmunocromatográficos desarrollados en base a la utilización de distintos anticuerpos. Estos sistemas declaran una sensibilidad de entre 2 a 4 ppm de gluten (2 a 4 mg/kg).

Western Blot

La técnica de Western Blot es un método inmunológico altamente específico que suministra la información cualitativa y cuantitativa necesaria para detectar proteínas en muestras complejas. Consiste en la extracción de las prolaminas del alimento, seguida de su separación electroforética en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), la posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa y finalmente la incubación con anticuerpos específicos frente a gliadinas de trigo marcados para poder luego ser revelados mediante una reacción enzimática.

Como ventajas de las técnicas de Western Blot, frente a los sistemas ELISA, podemos destacar que son métodos altamente específicos y que suministran más información cualitativa y cuantitativa que los sistemas ELISA ya que las proteínas extraídas se someten a una separación mediante electroforesis, antes de la hibridación con anticuerpos específicos en la membrana. La separación electroforética nos aporta información sobre el peso molecular de las proteínas extraídas.

Otra ventaja es una mayor eficacia en la detección de proteínas insolubles. La separación de las proteínas se realiza en condiciones desnaturizantes, es decir, en condiciones que provocan la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de las proteínas, lo que puede favorecer la solubilidad de dichas proteínas.

Como limitaciones al método, hay que considerar que es mucho más difícil de llevar a cabo y requiere mayor formación y especialización. La principal limitación en la aplicación de esta tecnología a la detección de gluten en alimentos, hoy por hoy, es la falta de disponibilidad de anticuerpos comerciales específicos y fiables, para poder detectar con mayor especificidad las gliadinas y otras prolaminas alergénicas. Por el momento únicamente se distribuye comercialmente un anticuerpo policlonal obtenido frente a las gliadinas de trigo, que muestra una gran afinidad por las proteínas alergénicas de trigo, cebada, centeno y avena, pero que simultáneamente muestra reacción cruzada con otros cereales no alergénicos.

Mediante Western Blot es posible conseguir un límite de cuantificación de gluten de 8 ppm (8 mg/kg) en alimentos.

Limitaciones de las técnicas inmunológicas

La extracción del gluten de los alimentos procesados es uno de los principales inconvenientes, y uno de los retos a alcanzar para poder llegar a desarrollar técnicas de detección fiables y exactas. Cuando las proteínas se desnaturizan durante el procesado de los alimentos puede suceder que los anticuerpos específicamente diseñados no reconozcan sus antígenos específicos, llegando a dar resultados erró-

neos, como falsos negativos. Por otro lado, también pueden dar lugar a reacciones cruzadas entre proteínas estrechamente relacionadas y originar errores como falsos positivos.

La mayoría de los alimentos destinados al consumo por pacientes celíacos están formados por matrices complejas de proteínas y otros compuestos. Algunas sustancias presentes en estas matrices tales como surfactantes, compuestos fenólicos, ácidos grasos, fosfatasa endógenas y otras enzimas, son capaces de inhibir las interacciones específicas entre el antígeno y el anticuerpo.

La búsqueda de un método que garantice la extracción total del contenido de gluten en alimentos es por el momento uno de los grandes objetivos para garantizar métodos de cuantificación seguros y fiables. La extracción de las prolaminas alergénicas del gluten mediante etanol al 60% ha sido hasta hace unos años el método más utilizado para la extracción de las prolaminas en muestras de alimentos. Sin embargo, se ha comprobado que debido al hecho de que las prolaminas interactúan mediante sus puentes disulfuro con otras prolaminas y con el resto de componentes existentes en las matrices complejas de los alimentos, la efectividad de la extracción mediante etanol al 60% es baja. Para incrementar la solubilidad de las prolaminas se ha propuesto y generalizado en los últimos años la utilización de agentes reductores como 2-mercaptoetanol y agentes desnaturizantes como clorhidrato de guanidina simultáneamente con el etanol en los procesos de extracción ("Solución cocktail") (García et al., 2005). La incorporación de estos componentes al proceso de extracción parece ser una herramienta adecuada para facilitar la extracción de gluten en los alimentos procesados. Sin embargo, recientemente se han publicado trabajos que afirman que estas sustancias reductoras y desnaturizantes pueden afectar a la reactividad del anticuerpo, causando interferencias en la interacción del antígeno con el anticuerpo y conduciendo a errores en la cuantificación del contenido de gluten (Doña et al., 2008). Además, hay que tener en cuenta que existen diferentes tipos de matrices entre los alimentos factibles de ser consumidos por los pacientes celíacos en los que la extracción de las prolaminas resulta difícil. Por ejemplo, cervezas y otras bebidas alcohólicas, siropes, salsas de soja, productos con alto contenido en grasas y taninos, chocolates, alimentos hidrolizados, maltodextrinas, almidones, preparados de alimentación infantil a base de frutas, lo que hace cuestionar la capacidad de los métodos analíticos para ese tipo de productos.

Otra de las grandes dificultades con las que nos debemos enfrentar a la hora del desarrollo y control de los métodos de análisis de gluten es la carencia de Material de Referencia de Valor Certificado de contenido de gluten o gliadina. Actualmente, se dispone de un Material de Referencia denominado "PWG-gliadin" que consiste en gliadina liofilizada aislada de una mezcla de trigos procedentes de distintos cultivos y preparada por el *Prolamin Working Group* (PWG-gliadin), para poder ser utilizado como material de referencia. Sus características han sido bien establecidas (Eckert et al., 2006).

Técnicas no inmunológicas

La identificación de proteínas mediante el empleo del denominado "mapeo de masas" o huella peptídica, englobada en el área denominada como proteómica, es una de las principales aplicaciones de la espectrometría de masas.

La posibilidad de la aplicación de estas potentes herramientas no inmunológicas (la espectrometría de masas, MALDI/TOF-MS, cromatografía líquida-espectrometría de masas), a la detección de gluten en

alimentos tiene como ventaja que, a diferencia de los métodos ELISA y Western Blot (*Inmunoblotting*), permite identificar prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena sin necesidad de utilizar anticuerpos específicos frente a las prolaminas, uno de los puntos más críticos y problemáticos de los métodos disponibles actualmente.

El fundamento de los métodos se basa en la comparación de los perfiles de las proteínas extraídas del alimento frente a los perfiles característicos (espectros de masas) de las diferentes prolaminas extraídas de estándares de cereales.

El método es rápido, el manejo e interpretación rutinarios de los espectros es relativamente sencillo, la manipulación de la muestra fácil y reproducible y el costo del análisis es bajo. Sin embargo, el equipo es costoso, no accesible a cualquier laboratorio, y requiere instalaciones amplias, siendo complejo el proceso de elaboración de bibliotecas de perfiles de espectros y la calibración del equipo.

2. Métodos de análisis basados en la detección de ADN

Los métodos analíticos basados en la detección de ADN son eficaces cuando el alimento ha sido procesado o bien tratado físico-químicamente (calor, presión, etc.), ya que la proteína puede haberse desnaturalizado o degradado en el proceso, y los métodos analíticos de proteína se ven afectados por estos cambios. El ADN, en cambio, puede haberse fragmentado durante el proceso en trozos pequeños, pero ello no implica necesariamente que no puedan ser detectados. Aunque el ADN también se degrada durante la esterilización por calor en el procesado de enlatado de alimentos, todavía es posible obtener pequeños fragmentos con suficientes diferencias de secuencia como para hacer posible la diferenciación entre especies cercanas.

Sin embargo, dada la característica funcional de las prolaminas como proteínas alergénicas, los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos suministran una información parcial e incompleta cuando son aplicados al análisis rutinario del contenido de gluten en alimentos, al no dar información sobre la integridad y funcionalidad de los epitopos (péptidos alergénicos) de las proteínas responsables de originar la reacción alérgica. En este sentido, lo que se detecta es ADN, pero es la proteína o sus péptidos la sustancia alergénica, y no se sabe qué grado de traducción a proteínas tiene el ADN detectado.

En realidad, la información que se adquiere con estos análisis es la confirmación de la presencia en el material analizado de una determinada especie vegetal, aunque se desconoce la integridad y funcionalidad de la misma en el momento del análisis. En lo que respecta al gluten, tiene mucho más interés funcional detectar la proteína o los péptidos alergénicos que el ADN.

Las técnicas basadas en la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y actualmente PCR en tiempo real pueden ser fácilmente aplicadas a la detección de ADN de gluten en alimentos.

Mediante PCR podemos aumentar o amplificar la cantidad de ADN que se pretende detectar. La elección de una adecuada secuencia diana hacia la que se dirige la amplificación, así como el diseño de los cebadores (*primers*) y el tamaño del fragmento amplificado son de vital importancia para conseguir un resultado adecuado.

La detección de fragmentos específicos de ADN, mediante la realización de tantas PCRs selectivas como se considere conveniente para identificar las distintas variedades vegetales implicadas en la acción nociva del gluten, permiten confirmar la presencia de ADN de una determinada especie vegetal u otra en la muestra de alimento (ADN de trigo, cebada, centeno, etc.).

3. Nuevas metodologías

Empiezan a ser aplicadas nuevas tecnologías a la detección de gluten en alimentos basadas en la utilización de biosensores. Estos dispositivos aportan como ventajas la posibilidad de automatizar y miniaturizar tanto la extracción como la detección de gluten de una forma sencilla y rápida. El inconveniente es la dificultad del desarrollo y el alto coste de utilización de forma rutinaria de estos sistemas una vez comercializados.

Se han descrito sistemas de biosensores, utilizando proteínas recombinantes y de inmunosensores electroquímicos, basados en la utilización de un anticuerpo desarrollado frente a un epítipo dominante en la fracción nociva del gluten (Nassef et al., 2008), para su aplicación a la detección de gluten. Según los autores, algunos de los estudios desarrollados muestran una excelente correlación entre los resultados obtenidos por estos novedosos sistemas y la técnica ELISA, por lo que estos sistemas podrán en un futuro ser aplicados al análisis de gluten en alimentos crudos y procesados.

Problemas generales planteados por los métodos de medición de gluten

Son varios los problemas planteados en la determinación de gluten, aún por resolver.

No está estudiada la relación entre los valores de gluten medidos en los alimentos y su nocividad en pacientes celíacos. Los procedimientos de determinación de gluten no se han valorado mediante ensayos clínicos (Lester, 2008).

La composición exacta del gluten varía entre especies y tipos de cereales, así como su forma de cultivarlos. Además, la industria alimentaria utiliza procedimientos en la preparación de ingredientes y alimentos que modifican el gluten física, química o enzimáticamente. Estas modificaciones pueden afectar la solubilidad del gluten, sus asociaciones intermoleculares, así como la capacidad de acceso a los epítopos significativos, o a su estructura. Es lógico que todos estos factores influyan en los protocolos de determinación de gluten, tanto durante la extracción como la inmunodetección.

Probablemente, la mayor dificultad para la determinación de gluten en los alimentos es conseguir una correcta normalización de las mediciones. Se ha considerado que la parte más soluble del gluten, la gliadina, es el mejor patrón para la determinación de gluten, pero puede que no se corresponda exactamente con el gluten presente en cada caso. El avance en el conocimiento molecular sobre la patología de la enfermedad celíaca, así como el conocimiento de las propiedades estructurales de las prolaminas y la mayor sensibilidad de los métodos cuantitativos disponibles en la actualidad plantean la pregunta de si es conveniente medir las prolaminas como un conjunto de proteínas o si deberían desarrollarse métodos de cuantificación altamente selectivos para un determinado péptido identificado como tóxico.

Conclusiones del Comité Científico

El problema de capital importancia que plantea el tratamiento de la enfermedad celíaca es un seguimiento correcto de una dieta sin gluten. Este seguimiento no sólo está condicionado por una buena colaboración por parte del paciente y su entorno, sino también por una valoración fiable del gluten que puede estar presente en los alimentos.

Los métodos inmunológicos son actualmente los métodos de elección para la detección de gluten en alimentos. La aplicación de otras metodologías como detección de proteínas por métodos no inmu-

nológicos (fundamentalmente espectrometría de masas) o detección de ADN de cereales alergénicos, se consideran de gran validez como métodos de confirmación.

Aunque en los últimos años han sido muchos los avances sobre los sistemas de detección de gluten en alimentos, quedan aún grandes retos por resolver sobre los que es necesario seguir trabajando. Primero, llegar a conocer la fracción tóxica, con el fin de diseñar anticuerpos específicos que sean capaces de detectar la totalidad del gluten tóxico. Segundo, profundizar en el desarrollo de sistemas de extracción que garanticen la completa extracción de gluten en todo tipo de alimentos. En tercer lugar es fundamental disponer de buenos estándares para la determinación de gliadinas y gluteninas, para conseguir homogeneidad en los resultados analíticos.

Es necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías, buscando aumentar la sensibilidad y especificidad de los métodos existentes, que permitan, de forma sencilla, rápida y económica, la detección segura y fiable del contenido de gluten en alimentos.

Referencias

- AESAN (2005). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Opinión del Comité Científico sobre el nivel de seguridad de prolaminas en alimentos sin gluten, en relación con la recidiva de pacientes celíacos. Nº de Referencia: AESA-2005-010.
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M. y McAdam, S.N. (2000). The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *The Journal of Experimental Medicine*, 191, pp: 603-612.
- Casellas, F. (2006). Enfermedad celiaca. *Medicina Clínica*, 126, pp: 137-142.
- Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I. y Fasano, A. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, pp: 160-166.
- CODEX (2008). *Codex Alimentarius*. Codex Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Revised 2008. CODEX Stan 118-1979. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/291/cxs_118e.pdf [acceso: 16-12-2009].
- Collin, P., Thorell, L., Kaukinen, K. y Mäki, M. (2004). The safe threshold for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19, pp: 1277-1283.
- Collin, P., Mäki, M. y Kaukinen, K. (2007). Safe gluten threshold for patients with celiac disease: some patients are more tolerant than others. *American Journal of Clinical Nutrition*, 86, pp: 260.
- Dewar, D.H., Amato, M., Ellis, H.J., Pollock, E.L., González-Cinca, N., Wieser, H. y Ciclitira, P.J. (2006). The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18, pp: 483-491.
- Doña, VV., Fossati, C.A. y Chirido, F.G. (2008). Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis. *European Food Research and Technology*, 226 (3), pp: 591-602.
- Eckert, R., van Berghofer, E., Ciclitira, P.J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H.J., Ferranti, P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Méndez, E., Mothes, T., Novalin, S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A. y Wieser, H. (2006). Towards a new gliadin reference material— isolation and characterization. *Journal of Cereal Science*, 43, pp: 331-341.
- Fasano, A. y Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120, pp: 636-651.

- García, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H. y Méndez, E. (2005). Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17, pp: 529-539.
- Green, P.H. y Cellier, C. (2007). Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*, 357 (17), pp: 1731-1743.
- Green, P.H. y Jabri, B. (2003). Coeliac disease. *Lancet*, 362, pp: 383-391.
- Green, P.H.R., Stavropoulos, S.N., Panagi, S.G., Goldstein, S.L., McMahon, D.J., Absan, H. y Neugut, A.I. (2001). Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. *American Journal of Gastroenterology*, 96, pp: 126-131.
- Hischenhuber, C., Crevel, R., Jarry, B., Mäki, M., Moneret-Vautrin, D.A., Romano, A., Troncone, R. y Ward, R. (2006). Safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23, pp: 559-575.
- Howdle, P.D. (2006). Gliadin, glutenin or both? The search for the Holy Grail in coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18, pp: 703-706.
- Immer, U., Gößwein, Ch. y Lauterbach, S.H. (2007). RIDASCREENÒ Gliadin competitive-new assay format for R5 antibody. 22nd Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity.
- Janatuinen, E.K., Kempainen, T.A., Julkunen, R.J., Kosma V.M., Mäki, M., Heikkinen, M. y Uusitupa, M.I. (2002). No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut. An International Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 50, pp: 332-335.
- Janssen, F.W., Klinken, F., Immer, U. y Gößwein, Ch. (2007). Safety of Asian soy sauces in gluten-free diet. 22nd Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity.
- Kagnoff, M.F. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 117, pp: 41-49.
- Koning, F., Gilissen, L. y Wijmenga, C. (2005). Gluten: a two-edged sword. Immunopathogenesis of celiac disease. *Springer Seminars in Immunopathology*, 27, pp: 217-232.
- Lester, D.R. (2008). Gluten measurement and its relationship to food toxicity for celiac disease patients. *Plant Methods*, 4: 26doi:10.1186/1746-4811-4-26. Disponible en: <http://www.plantmethods.com/content/4/1/26> [acceso: 9-2-2010].
- Lundin, K.E., Nilsen, E.M., Scott, H.G., Löberg, E.M., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Løvik, A. y Kett, K. (2003). Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut. An International Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 52, pp: 1649-1652.
- Mearin, M.L. (2007). Celiac disease among children and adolescents. *Current problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 37, pp: 86-105.
- Méndez, E., Vela, C., Immer, U. y Janssen, F.W. (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 17, pp: 1053-1063.
- Nassef, H.M., Bermudo Redondo, C., Ciclitira, P.J., Ellis, H.J., Fragoso, A. y O'Sullivan, C.K. (2008). Electrochemical immunosensor for detection of celiac disease Toxic Gliadin in Foodstuff. *Analytical Chemistry*, 80 (23), pp: 9265-9271.
- NIH (2005). National Institutes of Health. Statement. NIH Consensus Development Conference on Celiac Disease. *Gastroenterology*, 128 (suppl 1), pp: S1-S9.
- Osborne, T.B. (1907). The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institution Publications*, 84, pp. 235-237.
- Peräaho, M., Kaukinen, K., Mustalahti, K., Vuolteenaho, N., Mäki, M., Laippala, P. y Collin, P. (2004). Effect of an oats-containing gluten-free diet on symptoms and quality of life in coeliac disease: a randomized study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39, pp: 27-31.
- Polanco, A.I. Ed. (2008). Libro blanco de la enfermedad celíaca. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. Madrid, ICM.
- Rostom, A., Murray, J.A. y Kagnoff, M.F. (2006). American Gastroenterological Association (AGA). Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*, 131, pp: 1981-2002.

- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M. y Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297, pp: 2275-2279.
- Shewry, P.R. (1995). Plant storage proteins. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 70, pp: 375-426.
- Skerritt, J.H. y Hill, A. (1991). Enzyme Immunoassay for Determination of Gluten in Food: Collaborative Study. *Journal Association of Official Analytical Chemist*, 74 (2), pp: 257-264.
- Thompson, T. (2003). Oats and the gluten-free diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 103, pp: 376-379.
- UE (2009). Reglamento (CE) N° 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. DO L 16 de 21 de enero de 2009, pp: 3-5.
- Valdés, I., García, E., Llorente, M. y Méndez, E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 15, pp: 465-474.