

Trabajo de Especialización



Primera Etapa en el desarrollo de un ELISA competitivo para la determinación de la proteína FABP-I aplicado a pacientes celíacos

Por Clarisa PASCUAL¹, Julián BELGAMO², Betina CÓRSICO², Silvia G CORREA³

1. Sanatorio Allende, Córdoba.

2. Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP)- CONICET, La Plata.

3. Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas-UNC, Córdoba

RESUMEN

La proteína intestinal de unión a ácidos grasos (FABP2 o I-FABP), ha sido propuesta como un marcador temprano y específico de daño de la mucosa del intestino delgado en la enfermedad celíaca (EC). Las concentraciones circulantes elevadas de I-FABP se asocian con grados crecientes de atrofia de las vellosidades intestinales y con la pérdida de la integridad de la barrera epitelial intestinal. Por lo tanto, esta proteína se podría utilizar como una herramienta más en el diagnóstico y seguimiento de esta patología.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un enzimo-inmuno ensayo (ELISA) competitivo, para lograr una detección altamente sensible de I-FABP, y cuantificar esta proteína en muestras de suero de pacientes con EC. Para ello, se sensibilizó una placa de ELISA con la proteína pura, y luego se aplicó una mezcla de anticuerpo específico anti I-FABP y competidor (proteína recombinante). Con el agregado de un anticuerpo 2rio y el sustrato correspondiente de la enzima del conjugado, se pudo revelar la reacción. Se realizó una curva de calibración con 6 concentraciones de I-FABP, en un rango de 4,12 a 140 ng/ml.

Mediante ensayos de inhibición, se pudo corroborar cómo concentraciones crecientes de la proteína I-FABP purificada, redujeron la unión del anticuerpo anti I-FABP a la I-FABP adsorbida a la placa, dando como resultado menor señal de absorbancia, a

mayores concentraciones de I-FABP y evidenciando así la competencia del anticuerpo primario específico por los sitios de unión al antígeno entre ambas proteínas: la I-FABP pegada a la placa y la I-FABP pura en solución.

INTRODUCCION

La barrera intestinal es un elemento crucial para limitar la penetración de las bacterias del lumen y está integrada por el epitelio, el mucus, la IgA secretoria (IgAs) y proteínas y péptidos antimicrobianos, que inhiben y regulan el crecimiento de las bacterias en la proximidad del epitelio (1). Las células epiteliales promueven la absorción de agua y nutrientes y las proteínas de unión estrecha sellan el espacio entre las células adyacentes (2). El epitelio se renueva cada 5-7 días y la alta tasa de recambio de este tejido sirve como mecanismo protector para remover células dañadas o infectadas (1, 3).

La microbiota intestinal es en gran parte de naturaleza simbiótica (4) y cumple una función específica en el mantenimiento de la integridad estructural de la barrera, en la inmunomodulación (5) y en diversos procesos como la descomposición y absorción de nutrientes, la producción de vitaminas y hormonas y la prevención de la colonización por patógenos (4,5). Muchos de los efectos tróficos y estimulantes de la microbiota se atribuyen a los productos derivados de la actividad metabólica (6).

La gran especialización del sistema inmune residente en la mucosa intestinal ha posibilitado adaptaciones para cumplir funciones opuestas: permitir la coexistencia con la microbiota sin provocar inflamación franca y a su vez, proporcionar una respuesta efectora acorde a distintos tipos de patógenos. En el estado de homeostasis, el epitelio intestinal absorbe nutrientes y previene la translocación de bacterias lumbinales. La reacción inmune excesiva está regulada por mecanismos que mantienen el perfil no inflamatorio y contribuyen a la preservación de la mucosa intestinal (1,7). Cambios en la composición, funcionamiento o actividad metabólica de la microbiota (disbiosis) se asocian a alteraciones en la permeabilidad epitelial que promueven el ingreso de antígenos o estímulos a la lámina propia (LP) y provocan un incremento de señales estimuladoras que comprometen la integridad epitelial y pueden llevar a inflamaciones crónicas. Estos efectos están asociados a la patofisiología de una variedad de desórdenes gastrointestinales (8). Así, la incrementada permeabilidad de la barrera intestinal contribuye a la patogénesis de la enfermedad celíaca (EC), a las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), al síndrome de intestino irritable (SII) y a la alergia alimentaria (1). Por lo tanto, la evaluación de la permeabilidad intestinal y los mecanismos moleculares relacionados, podrían convertirse en un parámetro interesante a considerar en la práctica clínica para estudiar y monitorear estas enfermedades (9).

Se han propuesto varios biomarcadores plasmáticos y urinarios para medir la permeabilidad intestinal y la pérdida de la integridad de la barrera en las EII, como las proteínas de unión estrecha (TJs), la citrulina y la calprotectina (1, 10). Sin embargo, estas pruebas no serían lo suficientemente específicas porque muchas condiciones alteran la permeabilidad del intestino en general (11, 12).

La proteína que une ácidos grasos o lipocalina intestinal (FABP) representa el 2% de las proteínas citosólicas de los enterocitos maduros del intestino delgado y grueso (13). Es una proteína citosólica pequeña (14-15 kDa), soluble en agua que une con alta afinidad los ácidos grasos de cadena larga (FA) y otros ligandos hidrofóbicos y participa en la captación y el tráfico de lípidos (14, 15). En el intestino se detectan tres tipos de

FABP: la FABP intestinal (I-FABP) localizada predominantemente en el yeyuno y menos en el colon, la FABP hepática (L-FABP) presente en el hígado, riñón e intestino, y la proteína de unión a ácidos biliares ileal (II-FABP) de localización exclusiva en el íleon (13-15). Los enterocitos procesan los productos de hidrólisis de los lípidos de la dieta y las FABP son críticas para esta actividad (14).

Su detección en suero se asocia a la ruptura de la membrana de los enterocitos por lo que podría ser un marcador sensible del daño epitelial (9, 13, 14). Los niveles basales de la I-FABP reflejan el recambio fisiológico de los enterocitos (4), pero tras la destrucción celular, esta proteína se libera fácilmente a circulación sistémica (13). Los niveles elevados en sangre o en orina indicarían daño de la barrera intestinal, con relevancia pronóstica para la actividad de la EC (16). Dado que I-FABP está altamente expresada en la extremidad de las vellosidades, se la ha propuesto como un marcador temprano de daño intestinal en EC (17) y sus niveles séricos podrían servir para discriminar pacientes con EC de individuos controles sanos. En el suero de pacientes con dieta libre de gluten (GFD), los niveles de I-FABP son similares a controles, por lo que esta proteína podría emplearse para el seguimiento de la respuesta al tratamiento en EC (16). Por otra parte, individuos con sensibilidad al gluten no celíacos (NCWS) que muestran una variedad de síntomas en respuesta a la ingestión de trigo y cereales relacionados, pero sin marcadores serológicos, histológicos o genéticos de la EC, presentan altos niveles de I-FABP circulantes que se correlacionan fuertemente con los niveles de proteína que une LPS (LBP) y CD14 soluble (sCD14) (18). Estos hallazgos sugieren un vínculo entre el daño de las células epiteliales intestinales y la activación inmune sistémica en respuesta a productos microbianos trastocados (19). Es atractivo intentar implementar métodos de detección de esta proteína ya que existe la necesidad de biomarcadores no invasivos que reflejen los diferentes cambios de la mucosa intestinal.

La I-FABP puede medirse con alta sensibilidad en plasma, suero y orina utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (20). Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas, de forma que se consigue una elevada sensibilidad y detectabilidad en la técnica, lo que tendría una gran aplicabilidad en el diagnóstico clínico (21). Existen ensayos tipo ELISA sándwich no competitivo para FABP basados en el uso de dos anticuerpos monoclonales, el de captura y el detector que reconocen diferentes epitopes de la proteína (22-24). Dadas las características de la I-FABP detalladas anteriormente, sería relevante y útil, poder estandarizar un ensayo para medir con alta sensibilidad y especificidad los niveles de esta molécula en muestras de suero en nuestro medio. Considerando los elevados costos de los kits comerciales y la dificultad de adquirirlos regularmente nos propusimos realizar un ELISA competitivo adaptado de un trabajo previo, en el que se desarrolló un ELISA competitivo aplicado al control de alimentos aptos para celíacos (25), empleando un único anticuerpo específico anti I-FABP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Antígeno

Obtención y purificación del antígeno (I-FABP recombinante de rata)

El antígeno se obtuvo en el laboratorio de la Dra. Córscico (UNLP); se expresó ADNc de I-FABP de tipo salvaje de rata (con 90% de homología con la proteína humana y codificado en el plásmido pET-11a) en la cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* (26).

Lisis celular

El pellet de bacterias se trató con buffer de lisis TEK hipotónico (10 mM Tris, 1 mM EDTA y 40 mM KCl), y se lisó en un sonicador de punta Branson en un baño de agua-hielo. Los restos de pared celular y complejos supramacromoleculares se descartaron centrifugando a 10000 rpm, 30 min a 4°C. Se colocó inhibidor de proteasas y DNasa para eliminar ADN interferente. El pellet se conservó para SDS-PAGE (verificación de pureza de la proteína en cada paso del proceso) y al sobrenadante se le agregó 10 ml de (NH₄)₂SO₄ saturado y se incubó toda la noche a 4°C, en agitación para solubilizar la proteína.

Purificación

La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min en una centrífuga refrigerada, recuperándose las I-FABP en la fracción soluble. La purificación involucró dos pasos cromatográficos: exclusión por tamaño secuencial (Sephadex G-50) seguido de cromatografía de intercambio aniónico (DE-52), y finalmente delipidación usando una columna Lipidex-1000.

Separación proteica

Columna G-50 Sephadex – Exclusión por tamaño secuencial

Para el lavado de la columna se utilizó buffer fosfato (PO₄ 10 mM, KCl 150 mM, pH=7,4) como eluyente; se reguló un flujo de 1ml/min y se sembraron aproximadamente 25 ml de sobrenadante. Se recolectaron los volúmenes eluidos con un colector de fracciones y se midió la absorbancia a 280 nm para evidenciar la proteína. La I-FABP eluyó como un pico importante luego de la mezcla de proteínas presentes en el volumen muerto de la columna. Se separaron los tubos de interés en donde había I-FABP y los 15 ml resultantes fueron dializados toda la noche a 4°C con 1000 ml de buffer Tris PO₄ 10 mM pH= 8,5.

Columna Whatman DE-52 – Cromatografía de intercambio iónico

El pool de I-FABP se eluyó usando buffer fosfato pH= 7,4 a través de una columna de intercambio aniónico DE-52 (GE Healthcare) de modo de eliminar el ADN contaminante. Con el pool de proteína se realizó un espectro de absorbancia de 200 a 300 nm de modo de evidenciar la ausencia del pico de ácidos nucleicos a 260 nm.

Columna Lipidex 1000

Finalmente, en el último paso de purificación se hizo la delipidación de la I-FABP pura utilizando una columna rellena con Lipidex 1000 (hidroxialcoxi-propil-dextran Tipo IV, Sigma) que retiene todos los sustratos hidrofóbicos. Se reguló un flujo de 0,5 ml/min a 37°C, con el mismo buffer fosfato pH=7,4. Se sembró toda la muestra obtenida de la corrida cromatográfica de intercambio iónico (Columna DE52), previa concentración de la proteína purificada en un dispositivo concentrador de presión positiva (Millipore) para alcanzar una concentración superior a 1 mg/ml, con el objetivo de prolongar la vida útil a -80°C.

El volumen sembrado fue aproximadamente de 7 ml y se usó buffer fosfato. Las fracciones obtenidas se midieron a 280 nm para determinar en qué tubos se encontraba la I-FABP. La proteína obtenida se alicuotó y se conservó a -80°C .

Anticuerpos

Anticuerpo 1rio

Se usó un anticuerpo (Ac) anti I-FABP comercial de conejo (ITT 5874. Polyclonal Antibody Biosciences Geno Technology Inc., EEUU) que detecta I-FABP humana, de rata o de ratón; concentración 1 mg/ml.

Anticuerpo 2rio

Se usó un Ac anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Anti rabbit IgG-peroxidase, Sigma A0545; solución en 0,01 M en buffer fosfato pH 7,4 conteniendo 0,05% de metilisotiazolinona como conservante), generosamente aportado por la Dra. Lilian Canavoso.

Muestras y sujetos en estudio

Se trabajó con muestras de suero almacenadas en la seroteca del Sanatorio Allende, de pacientes y controles adultos, recolectadas por venopunción y conservadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

Criterios de inclusión: pacientes adultos de entre 18 y 60 años de ambos sexos, con EC o algún trastorno gastrointestinal.

Criterios de exclusión: Pacientes deficientes en IgA sérica.

Grupo 1: Pacientes recientemente diagnosticados con EC, triple positivos para Ac anti-transglutaminasa tisular, Ac anti-gliadinas deaminadas y Ac anti-endomisio. Biopsia intestinal positiva (N=24).

Grupo 2: Pacientes con EC diagnosticada, en tratamiento (EC-GFD), triple negativos para Ac anti-transglutaminasa tisular, Ac anti-gliadinas deaminadas y Ac anti-endomisio (N=24).

Grupo 3: Pacientes controles, con sintomatología gastrointestinal, no celíacos, triple negativos para Ac anti-transglutaminasa tisular, Ac anti-gliadinas deaminadas y Ac anti-endomisio (N=24).

RESULTADOS

1. Caracterización de la I-FABP recombinante.

La obtención y purificación del antígeno (I-FABP recombinante de rata) se hizo como se describió en Materiales y Métodos. Luego de la purificación, se calculó la concentración en base a la absorbancia a 280 nm utilizando como coeficiente de extinción molar, ϵ I-FABP= 16900 (27). La pureza de las proteínas purificadas se evaluó mediante una corrida electroforética en un gel de SDS-PAGE 15% (Figura 1).

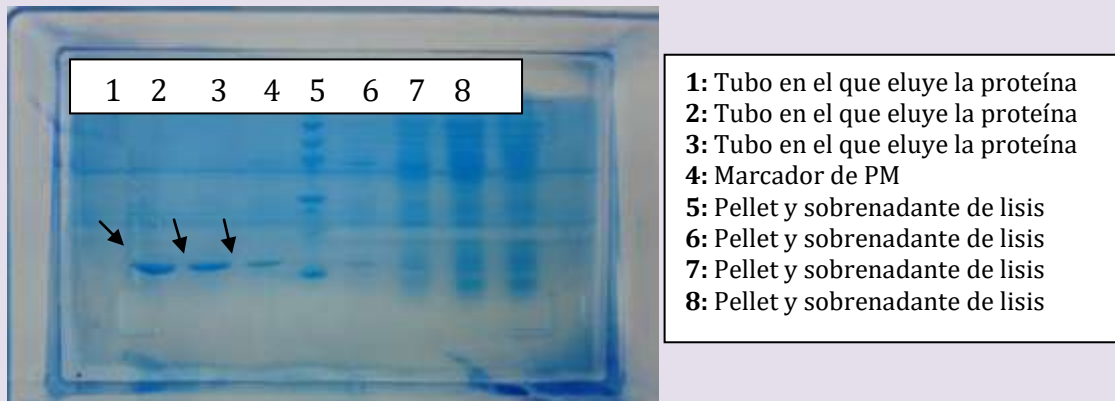


Figura 1. Evaluación de la pureza de la I-FABP recombinante de rata. A) SDS PAGE y tinción con azul Coomassie. La flecha muestra la I-FABP en los tubos de las fracciones colectadas de mayor pureza de proteína.

2. Espectro de I-FABP

La Figura 2 muestra el espectro de absorbancia de la I-FABP (solución al 1% v/v) en el rango 240-320 nm donde se observa la estructura conservada de la proteína I-FABP a 280 nm de longitud de onda. Este control se realizó ya que transcurrió un periodo de almacenamiento a -80°C mayor del planificado originalmente.

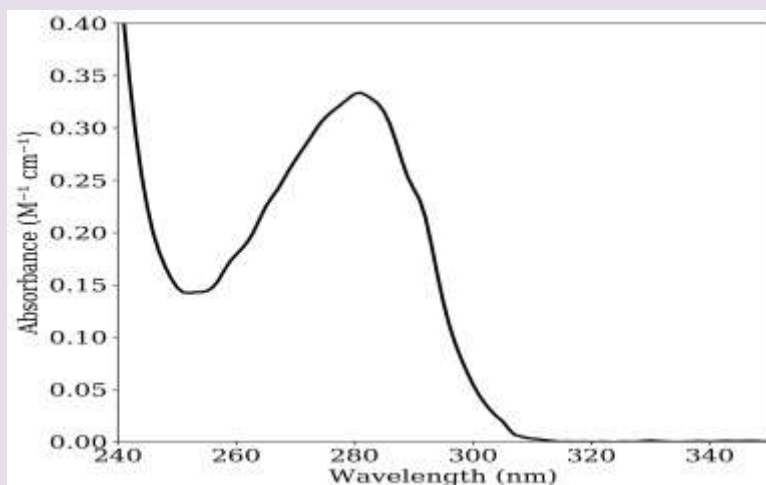


Figura 2. Espectro a 280 nm de la I-FABP recombinante.

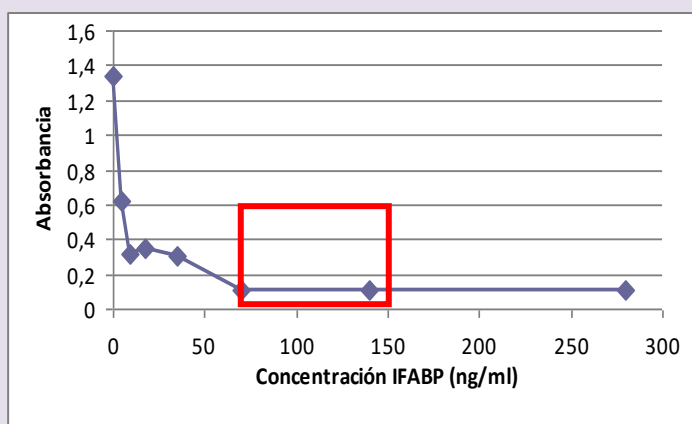
3. Optimización de variables experimentales:

Para la implementación del ensayo de ELISA se determinaron los siguientes parámetros:

- Concentración óptima de I-FABP purificada a inmovilizar en la placa que permita tener una señal detectable
- Tipo de material de la placa para desarrollar el ensayo
- Dilución óptima del Ac anti I-FABP

a) Concentración óptima de I-FABP a inmovilizar

La concentración óptima de I-FABP a inmovilizar se evaluó mediante el método de saturación con peroxidasa (25). Se utilizaron diferentes concentraciones de I-FABP (4,4-280 ng/ml) y una concentración fija y saturante de peroxidasa (1 mg/ml) la cual se adsorbe en los sitios no ocupados por la proteína en la placa. La actividad enzimática se detectó con una solución reveladora de TMB (Orgentec, Diagnostika GmbH, Mainz, Alemania) que se incubó al resguardo de la luz durante 5 min. La reacción se detuvo con una solución ácida de H₂SO₄ y se midió la absorbancia a 450 nm. La señal generada fue inversamente proporcional a la cantidad de I-FABP inmovilizada. La concentración óptima de I-FABP para sensibilizar la placa de ELISA fue de 100 ng/ml (Figura 3).



Concentración (ng/ml)	Abs
0	1,34
4,4	0,621
8,8	0,321
17,5	0,349
35	0,309
70	0,104
140	0,114
280	0,11

Figura 3. Determinación de la concentración óptima de I-FABP para sensibilización de la placa de ELISA

b) Tipo de material de la placa para desarrollar el ELISA

Se probaron dos superficies sólidas diferentes: placas de poliestireno convencionales o de poliestireno luego de irradiación gamma donadas generosamente por el Dr. Chamley (28). En el caso de las placas convencionales, con todas las diluciones de la I-FABP evaluadas se observaron absorbancias similares, sin diferencias significativas. Sin embargo, con el material irradiado, a mayor concentración de I-FABP las absorbancias debidas a la peroxidasa adsorbida fueron menores (datos no mostrados). Se pudo determinar así que la I-FABP no se une de igual manera a cualquier superficie siendo las placas de poliestireno con irradiación gamma las que mostraron mejor adsorción y desplazamiento de la peroxidasa, por lo que los restantes ensayos se hicieron en este tipo de placas.

c) Dilución óptima de conjugado

En placa de poliestireno según punto b) se inmovilizó I-FABP 100 ng/ml, se bloqueó con albúmina sérica bovina (ASB) al 3% en PBS-Tween y se probaron diluciones seriadas del Ac 1rio (**1:500 a 1:32000**) en PBS 1x, pH=7; luego de la incubación (1 hora a 37°C) se realizó el lavado correspondiente y se agregó el Ac 2rio (diluciones: **1:3000 y 1:6000**) y se incubó 1 hora más a 37°C. Se realizaron los lavados y se adicionó la solución reveladora de TMB. Se frenó la reacción con solución de H₂SO₄ y se midió la absorbancia

a una longitud de onda de 450 nm. En todos los casos (antígeno y Acs) el volumen usado fue de 50 µl por pocillo.

En base a las absorbancias obtenidas con las diluciones analizadas y a los menores niveles de background (datos no mostrados), se seleccionaron como óptimas para el ensayo la dilución 1:500 para el Ac 1rio y 1:5000 para el Ac 2rio.

4. Inhibición usando I-FABP recombinante soluble

Para establecer la inhibición de los sitios activos del Ac 1rio se sensibilizó la placa con I-FABP (100 ng/ml) y se realizó una curva de calibración con 6 concentraciones de I-FABP, en un rango de 4,12 a 140 ng/ml; la placa se incubó con el Ac 1rio sólo (representa el 100% unión), el Ac 2rio sólo (blanco de reacción) o el Ac 1rio luego de una incubación a 37°C por 60 min con las 6 concentraciones conocidas de I-FABP (Figura 4).

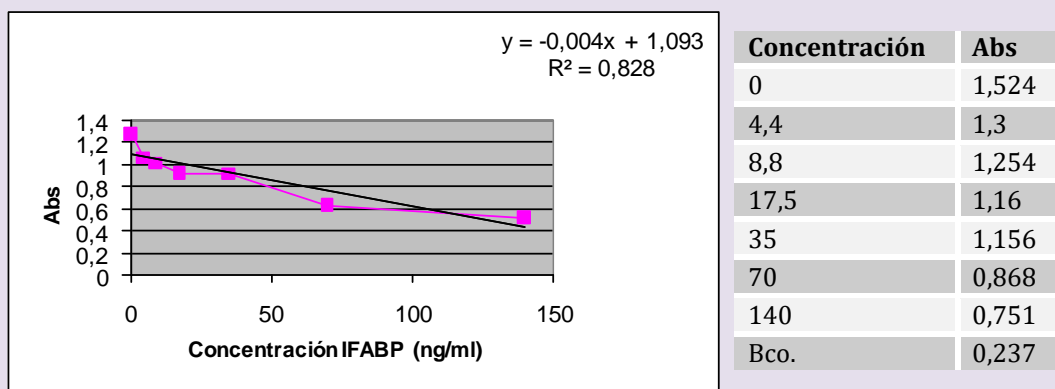


Figura 4. Ensayo de inhibición usando I-FABP recombinante

La ecuación de la regresión lineal obtenida fue $y = -0,0047x + 1,0939$ en el rango de 0-140 ng/ml de I-FABP.

El R2 obtenido fue 0,8285.

El coeficiente de correlación para este gráfico fue $r = -0,9102$.

5. Valoración de las muestras de pacientes con EC

Se sensibilizaron placas de poliestireno irradiadas con 50 µl de una solución de I-FABP 100 ng/ml. Para la determinación de I-FABP, se realizaron diluciones del suero de los pacientes 1/10, y se incubaron 50 µl de esas diluciones con 50 µl del Ac 1rio dilución 1/500, en tubos individuales por una hora a 37°C. Posteriormente, 50 µl de cada dilución se colocó en la placa de ELISA previamente sensibilizada y bloqueada y se incubó por 1 hora a 37°C. El Ac 2rio diluido 1:5000 se incubó una hora a 37 °C y se continuó con el ELISA como se describió anteriormente.

Para poder evidenciar la utilidad del ensayo propuesto, se trabajó con tres grupos de pacientes: celíacos al diagnóstico, vírgenes de tratamiento; celíacos tratados y pacientes no celíacos. A todos se les midió la I-FABP y luego con los datos obtenidos se procedió a calcular el porcentaje de inhibición del ensayo (Tabla 1). Se hicieron 3 experimentos similares empleando en cada caso 8 sueros por grupo.

Tabla 1. Inhibición con muestras de los grupos en estudio

	<i>Pacientes Triple Positivos (N=8)</i>	<i>Pacientes Triple Negativos (N=8)</i>	<i>Pacientes No Celíacos (N=8)</i>
	% de Inhibición		
Experimento 1	70,88 ± 25,54	76,42 ± 31,16	72,29 ± 11,16
Experimento 2	76,21 ± 14,67	86,63 ± 14,55	74,42 ± 16,56
Experimento 3	59,08 ± 17,90	73,96 ± 10,17	69,87 ± 15,95

DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un ELISA competitivo para la detección y cuantificación de I-FABP en muestras de suero de pacientes con EC, pacientes celíacos en tratamiento, y pacientes con algún trastorno/sintomatología intestinal, con patología celiaca descartada.

Los enterocitos de la parte superior de las vellosidades son el sitio inicial de destrucción en numerosas enfermedades intestinales (16). La I-FABP podría usarse como un marcador de lesión dada su alta especificidad y abundancia en este tejido, y su liberación rápida a circulación después de la lesión de la mucosa del intestino delgado (24).

Para la realización del ensayo se obtuvo la proteína I-FABP recombinante purificada, con una banda única en un SDS-PAGE, con una concentración de 0,2 mM. El espectro mostró un pico a 280 nm que corresponde a 2 triptófanos (en posición 6 y 82) y dos clusters de cadenas laterales aromáticas, uno formado por Fen47, Fen62 y Trp82 y el segundo que involucra Tyr14, Fen17, Tyr17 y Tyr19 (29).

Para el ensayo propuesto, se pudo determinar la matriz sólida más adecuada a utilizar, la concentración óptima de antígeno para sensibilizar la placa, así como también la dilución de los Acs primario y secundario que generaron una mejor señal de absorbancia. Se pudo corroborar, además, mediante ensayos de inhibición, cómo concentraciones crecientes de I-FABP purificada, generaron un buen desplazamiento del complejo Ac anti-I-FABP-I-FABP soluble, dando como resultado menor señal de absorbancia, a mayores concentraciones de I-FABP. Se pudo evidenciar claramente, la competencia por los sitios de unión al antígeno, del Ac primario específico, con ambas proteínas: I-FABP pegada a la placa e I-FABP en solución, generando mayor disociación del Ac primario unido al antígeno pegado a la placa.

Se han desarrollado ensayos tipo ELISA sándwich no competitivo para FABP basados en el uso de dos Acs monoclonales, el de captura y el detector que reconocen diferentes epitopes de la proteína (22-24). En uno de estos ensayos, el ELISA no mostró ninguna reactividad cruzada con otros tipos de FABP e indicó excelentes características cuantitativas como reproducibilidad, linealidad de dilución y recuperación, indicando que con esta metodología se podrían medir con precisión las concentraciones séricas de I-FABP (24). A su vez, las curvas de calibración emplearon un rango de 0 a 50 ng/ml de I-

FABP, con un aumento de la absorbancia dependiente de la concentración (22). Además, estos autores determinaron el valor de referencia de I-FABP circulante en suero en una población sana, que fue de 2,0 ng/ml o menos, y esto no se vio afectado por sexo y/o edad (26) o 1,6 µg/L (24). El límite de detección fue lo suficientemente bajo para permitir la determinación precisa de las concentraciones de FABP en individuos sanos, y a su vez el rango amplio de medición usado permitió que las muestras de pacientes incluyan a más del 90% de las concentraciones de FABP informadas en muestras patológicas (23, 24). En base a estos reportes previos, en este trabajo se seleccionó un rango de 4,12 a 140 ng/ml de I-FABP para la calibración.

El ELISA competitivo, con inmovilización de la proteína pura en la placa fue adaptado de un trabajo previo (25), en el que se desarrolló un ELISA competitivo aplicado al control de alimentos aptos para celíacos. El método actual del Codex Tipo I para el análisis del gluten es el método ELISA R5 Méndez, que se calibra con el estándar de gliadina del Grupo de trabajo de prolamina (PWG) y es utilizado por los sistemas de control oficiales en toda Europa (30). El anticuerpo R5 es producido contra omega-Secalin de centeno con un límite de detección de 3 mg / kg de gluten y un rango de cuantificación de 5-80 mg / kg de gluten. Se pueden utilizar dos tipos de ELISA R5: sándwich y competitivo. El ELISA tipo sándwich R5 ha servido como prueba estándar de la industria alimentaria para el gluten, pero no es eficaz para identificar fragmentos hidrolizados mientras que el ELISA competitivo R5 es más sensible a los pequeños segmentos de proteínas que se encuentran en los alimentos fermentados.

En el ELISA competitivo diseñado, esperábamos, en base a estos alentadores ensayos previos con la proteína purificada, encontrar diferencias significativas entre los grupos seleccionados de pacientes, que determinarían una disparidad entre individuos con la enfermedad recién diagnosticada, e individuos en tratamiento y controles. Sin embargo, los valores de absorbancia obtenidos en las muestras de pacientes, no mostraron diferencia significativa alguna entre los grupos, siendo en todos los casos, valores de absorbancia bajas, que se corresponderían con altas concentraciones de proteína.

Uno de los factores que podría haber influido, es la gran concentración de proteínas de los sueros, ya que usamos diluciones 1:10, pudiendo haber interacciones no específicas con los Acs que impidieran la unión específica con el antígeno adsorbido la placa. Otra limitación de nuestro ensayo podría ser el uso de un Ac policlonal, ya que algunos autores han reportado que utilizando sólo un tipo de Ac policlonal de conejo para medir concentraciones de I-FABP los resultados no resultaron satisfactorios en términos de sensibilidad y especificidad (31). Los compuestos endógenos que interfieren comúnmente con los inmunoensayos clínicos incluyen hemoglobina, bilirrubina y paraproteínas y pueden producir resultados falsamente aumentados cuando los interferentes entrecruzan los Acs de captura y detector y simulan la presencia del analito, lo que podría haber ocurrido con las muestras del grupo no celíaco (32). La combinación de Acs monoclonales y policlonales sería más adecuada para el uso en la investigación y la química clínica de I-FABP porque de esa manera se reconocerían epitopes nativos y desnaturalizados, lo que sería fundamental en muestras de sangre (31).

Otro factor a tener en cuenta es que quizá en los pacientes en tratamiento, los niveles de I-FABP persistieron altos, a pesar de la ausencia de atrofia de las vellosidades

y los niveles negativos de IgA-tTG. Esto sería indicativo de daño intestinal de bajo grado, incluso después del inicio del tratamiento. En este sentido, el daño de la mucosa en la EC en edad adulta es de recuperación lenta e incompleta (13). De acuerdo con esto, en un estudio de la I-FABP en pacientes con EII usando un ELISA “in house”, se demostró que los niveles plasmáticos de I-FABP no difirieron entre la enfermedad endoscópica activa y la remisión tanto en la enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerativa. Sólo cuando se empleó una estricta combinación de clínica con bioquímica para estratificar a los pacientes se observó una reducción de la I-FABP en colitis activa (33). Notablemente, estos autores determinaron valores de I-FABP (mediana de 125 y 147 pg /ml) en enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa más bajos que los informados en pacientes con EC no tratados y con atrofia de las vellosidades. Empleando un ELISA “in house” altamente específico que detecta selectivamente I-FABP humana, se fijó un valor de cut-off de 382 pg / ml para discriminar entre pacientes con EC y sin EC (13). Estos autores encontraron niveles séricos de I-FABP significativamente elevados en pacientes con EC no tratada (mediana: 691 pg / ml); en individuos controles con sospecha de EC y prueba de Acs negativa, la concentración de I-FABP fue 178 pg / ml, surgiendo que esta proteína podría aportar una distinción fisiopatológica entre EC y las EII. En otro estudio, se observó un nivel significativamente mayor de I-FABP en pacientes con EC y una buena correlación entre el nivel de I-FABP y la anomalía de las vellosidades, pero los valores de I-FABP no mostraron un patrón específico (34). Estos autores usaron kits comerciales y propusieron un valor de corte óptimo de I-FABP \geq 1100 pg / mL para indicar la presencia de una anomalía vellosa de grado Marsh \geq 2 con una sensibilidad del 39,7% y especificidad del 95,5% (34). Por otra parte, en un meta-análisis evaluando la relevancia de la I-FABP como biomarcador de obstrucción intestinal por estrangulamiento, se demostró un alto grado de heterogeneidad entre los 8 estudios incluidos, lo que se atribuyó a diferencias en la condición de los pacientes y el momento de la colección de muestras de sangre, los Acs usados para el ELISA y el tamaño de la muestra (14).

A pesar de no haber podido desarrollar el ensayo por inhibición es importante continuar trabajando en la implementación de una alternativa local, ya que los kits comerciales son casi inaccesibles para su uso clínico. En resumen, para poder utilizar la determinación de I-FABP en suero en la práctica clínica, se necesitan más estudios que involucren un gran número de muestras y procedimientos validados, para poder contrastar los resultados de la nueva técnica, frente a un ensayo “gold estándar”, que permita realizar una comparación de métodos, además de valorar una población más grande de pacientes para tener una muestra más representativa de lo que realmente podría estar ocurriendo en los distintos trastornos.

Referencias

1. Wells JM y col. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312:G171–G193.
2. Wang L y col. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J Immunol Methods* 2015; 421:44–53.
3. Rodríguez-Colman MJ y col. Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature* 2017; 543(7645):424-427.
4. Bischoff SC y col. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* 2014; 14:189.

5. Jandhyala SM y col. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015; 21(29): 8787-8803.
6. Rooks MG y col. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol* 2016; 16(6):341-52.
7. Yap YA y col. An insight into the intestinal web of mucosal immunity, microbiota, and diet in inflammation. *Front Immunol* 2018; 9:2617.
8. Ryu Okumura y col. Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis. *Exp Mol Med* 2017; 49: e338.
9. Linsalata M y col. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhoea predominant-IBS: a case-control study. *BMC Gastroenterology* 2018; 18:167.
10. Samant H y col. Fecal calprotectin and its correlation with inflammatory markers and endoscopy in patients from India with inflammatory bowel disease. *Indian J Gastroenterol* 2015; 34(6):431-5.
11. Bjarnason I y col. Comparison of four markers of intestinal permeability in control subjects and patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29 (7): 630–639.
12. Cox MA y col. Measurement of small intestinal permeability markers, lactulose, and mannitol in serum: results in celiac disease. *Dig Dis Sci* 1999; 44 (2):402–406.
13. Adriaanse MPM y col. Serum I-I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 482–490.
14. Wu C y col. Intestinal fatty acid-binding protein as a biomarker for the diagnosis of strangulated intestinal obstruction: A meta-analysis. *Open Med (Wars)*. 2021;16(1):264-273.
15. Gajda y col. Storch. Enterocyte Fatty Acid Binding Proteins (I-FABPs): Different Functions of Liver- and Intestinal- I-FABPs in the Intestine. *Prost Leuk Essent Fatty Acids* 2015; 93:9–16.
16. Bottasso Arias NM y col. Expression Pattern of Fatty Acid Binding Proteins in Celiac Disease Enteropathy. *Mediators Inflamm* 2015; 738563.
17. Vreugdenhil AC y col. Additional value of serum I-I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand J Gastroenterol* 2011; 46(12):1435-41.
18. Carroccio A y col. Non-Celiac Wheat Sensitivity Diagnosed by Double-Blind Placebo-Controlled Challenge: Exploring a New Clinical Entity. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1898–1906.
19. Uhde M y col. Intestinal cell damage and systemic immune activation in individuals reporting sensitivity to wheat in the absence of coeliac disease. *Gut* 2016; 65:1930–1937.
20. Sarikaya M y col. Intestinal fatty acid binding protein (I-I-FABP) as a promising test for Crohn's disease: a preliminary study. *Clin Lab* 2015; 61(1-2):87-91.
21. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. Quinta Edición, Editorial Harcourt (2000).
22. Funaoka H y col. Development of a High-specificity Sandwich ELISA System for the Quantification of Human Intestinal Fatty Acid-Binding Protein (I-FABP) Concentrations. *Immunol Invest* 2011; 40:223–242.
23. Wodzig KW y col. One-step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma fatty acid-binding protein. *Ann Clin Biochem* 1997; 34:263-8.
24. Funaoka H y col. Intestinal fatty acid-binding protein (I-FABP) as a new biomarker for intestinal diseases. *Rinsho Byori*. 2010; 58(2):162-8.

25. Messina, GA. Desarrollo de un enzoinmunoensayo competitivo aplicado al control de alimentos para celíacos. Tesis de Maestría en Inmunología. Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. 2019.
26. Córscico B y col. The helical domain of intestinal fatty acid binding protein is critical for collisional transfer of fatty acids to phospholipid membranes Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(21):12174-8.
27. Richieri y col. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB, J Biol Chem 1994 ;269(39):23918-30.
28. Chamley LW y col. Conformationally altered beta 2-glycoprotein I is the antigen for anti-cardiolipin autoantibodies. Clin Exp Immunol 1999; 115(3):571-6.
29. Sacchettini JC y col. Crystal structure of rat intestinal fatty-acid-binding protein. Refinement and analysis of the Escherichia coli-derived protein with bound palmitate. J Mol Biol 1989; 208:327-39.
30. Hochegger R y col. Comparison of R5 and G12 Antibody-Based ELISA Used for the Determination of the Gluten Content in Official Food Samples. Foods 2015;4(4):654-664.
31. Satoshi K y col. Establishment and Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies Against Human Intestinal Fatty Acid-Binding Protein (I-FABP) using Synthetic Regional Peptides and Recombinant I-FABP. J Immunoassay & Immunochem 2008; 29: 19–41.
32. O'Regan TM y col. Development of a disposable immunosensor for the detection of human heart fatty-acid binding protein in human whole blood using screen-printed carbon electrodes. Talanta. 2002;57(3):501-10.
33. Bodelier AG y col. Plasma intestinal fatty acid-binding protein fails to predict endoscopic disease activity in inflammatory bowel disease patients. Eur J Gastroenterol Hepatol 2016; 28:807-13.
34. Singh A y col. Non-immunological biomarkers for assessment of villous abnormalities in patients with celiac disease. J Gastroenterol Hepatol. 2020;35(3):438-445.