

## Capítulo 21

### Detección de la fracción inmunotóxica del gluten: Aplicaciones en seguridad alimentaria

Isabel Comino<sup>1</sup>, Ana Real<sup>1</sup>, María de Lourdes Moreno<sup>1</sup>, Ángel Cebolla<sup>2</sup>, Carolina Sousa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España.

<sup>2</sup>Biomedal S.L.

[icomino@us.es](mailto:icomino@us.es), [arc@us.es](mailto:arc@us.es), [lmoreno@us.es](mailto:lmoreno@us.es), [cebolla@biomedal.com](mailto:cebolla@biomedal.com), [csoumar@us.es](mailto:csoumar@us.es)

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.24>

#### Referenciar este capítulo

Comino I, Real A, Moreno ML, Cebolla A, Sousa C. *Detección de la fracción inmunotóxica del gluten: Aplicaciones en seguridad alimentaria*. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 433-445.

## **Resumen**

En la actualidad, la única terapia existente para los pacientes celíacos es seguir una dieta sin gluten estricta durante toda su vida. Sin embargo, la dieta libre de gluten supone numerosas restricciones debido a sus implicaciones sociales y económicas. Varios estudios han sugerido que las transgresiones de la dieta son relativamente frecuentes en los pacientes celíacos. Por todo ello, y dada la importancia que supone a día de hoy el tratamiento nutricional en el manejo de la enfermedad celíaca, es fundamental el desarrollo de nuevas estrategias destinadas al control de la dieta. De hecho, existen cereales como la avena cuya toxicidad para los pacientes celíacos está en entredicho. Se ha demostrado que además de la sensibilidad interindividual de cada paciente hacia la avena, la inmunogenicidad de la misma varía en función del cultivar empleado. La incorporación de algunas variedades de avena inocuas en los alimentos libres de gluten, podría no sólo mejorar la calidad nutricional del paciente, sino también proporcionar ciertos beneficios en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el colesterol, la diabetes o problemas de tránsito intestinal. Además, en el estudio de otros cereales tóxicos para los pacientes celíacos, se ha encontrado que las variedades de cebada cultivables, aunque con diferencias entre ellas, presentan menores niveles de gluten tóxico en comparación con las silvestres. Este hecho resulta importante en los programas de selección de especies cultivables y a la hora de la elaboración de determinados alimentos y/o bebidas que proceden de cereales tóxicos.

## **Abstract**

The only therapy currently available to celiac patients is a life-long strict gluten-free diet. However, this generates numerous social and economic repercussions. Various studies have suggested that failure to comply with the diet is frequent in celiac patients. For this reason, and because of the importance given today to the nutritional aspect in the management of celiac disease, the development of new strategies for monitoring the gluten-free diet is essential. In this sense, the celiac-toxicity of cereals such as oats is questioned. Studies have shown that besides the inter-individual sensitivity to oats, the immunogenicity of this cereal for celiac patients varies according to the cultivars. The incorporation of harmless varieties of oats in food products not only may improve the nutritional quality but moreover, in the search for less-toxic barley, it has been demonstrated that the cultivated varieties contain lower levels of immunogenic gluten than do the wild ones.

## **1. Introducción**

En la actualidad, la única terapia existente para los pacientes celíacos consiste en el seguimiento de una dieta estricta ausente de gluten durante toda la vida, mediante la exclusión de la dieta de las proteínas tóxicas del trigo (gliadinas y gluteninas), y de sus homólogos en la cebada (hordeínas), el centeno (secalinas), y la avena (aveninas), así como los híbridos de estos cereales (como kamut y triticale) y sus derivados (almidón, harina, etc.)<sup>1</sup>.

En la mayoría de los pacientes celíacos el cumplimiento estricto de una dieta sin gluten (DSG) conduce, en pocos meses, a la recuperación rápida y completa de la arquitectura normal y la función de la mucosa del intestino delgado, así como a la remisión de los síntomas y a la normalización de las pruebas serológicas<sup>2</sup>. Sin embargo, el mantenimiento de una DSG no es tarea sencilla, no sólo por el elevado coste económico que implica, sino que existen también situaciones que favorecen su ingesta involuntaria, como por ejemplo, la presencia de gluten en una gran cantidad de productos manufacturados. Aproximadamente, más de la mitad de los alimentos que se comercializan a día de hoy contienen gluten de trigo, cebada, centeno o avena, incluyendo aquellos en los que sólo interviene como espesante o aglutinante. El riesgo que suponen estos alimentos para los celíacos hace conveniente un control riguroso del contenido en gluten.

En la normativa europea, la cantidad de gluten aceptada en los alimentos que optan a ser etiquetados como "exento de gluten" es de 20 partes por millón (ppm o mg/kg), aunque también se establece otra categoría: de alimentos con "contenido muy reducido en gluten", que se utiliza para productos fabricados con trigo, centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, pero que hayan recibido un tratamiento especial para eliminar el gluten. Los alimentos con el etiquetado de "contenido muy reducido en gluten" no pueden superar las 100 ppm (REGLAMENTO (EC) No 41/2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten, <http://bit.ly/RdEqVI>). Por ello, el control de productos libres de gluten requiere el uso de métodos cuantitativos, altamente específicos y con gran poder de detección. El empleo de métodos de control inadecuados expone a los pacientes celíacos a un riesgo elevado para su salud. Además, da lugar a graves perjuicios económicos y problemas legales asociados a una dudosa identificación de los productos libres de gluten. A nivel industrial, se debe realizar un control muy riguroso de las materias primas que emplean, y del producto final que comercializan.

Cuando se requiere certificar alimentos aptos para el consumo por pacientes celíacos, ningún producto está exento de análisis. La contaminación involuntaria y la adulteración ponen en serio riesgo la salud y calidad de vida de estos pacientes. El uso industrial de harina de trigo o componentes derivados de ella (almidón, gluten) utilizados con el fin de aumentar la capacidad de retención de agua, mejorar las características en la textura o preservar la estructura u otros atributos de calidad, conduce a la presencia de proteínas tóxicas en los productos menos sospechosos. Además, durante el proceso de elaboración, los alimentos se someten a tratamientos térmicos y a otros procesos que pueden modificar la estructura del gluten contenido en los mismos. Esta modificación de los productos supone una barrera para la correcta cuantificación del gluten.

Dada la complejidad del sistema a analizar, la única forma de proporcionar a los pacientes celíacos una dieta segura es el empleo de ensayos de alta sensibilidad y especificidad. Algunas

de las técnicas empleadas para el análisis de gluten son la espectrometría de masas, los métodos inmunológicos basados en anticuerpos monoclonales (AcMos) o las técnicas de PCR.

La espectrometría de masas se basa en la determinación de los espectros de masas característicos de diferentes fracciones del gluten. Además, con este tipo de técnicas se pueden caracterizar los péptidos contenidos en distintos tipos de alimentos<sup>3</sup>. No obstante, requieren instrumentación compleja, equipamiento costoso, instalaciones amplias, complejo proceso de elaboración de librerías de perfiles de espectros y compleja calibración del equipo.

Los AcMos producidos específicamente frente al gluten son las metodologías más empleadas en el análisis de alimentos. Estos anticuerpos reconocen regiones repetitivas del gluten<sup>4,5</sup> o han sido diseñados a partir de regiones conocidas como tóxicas, dentro de las secuencias proteicas del gluten<sup>6-9</sup>. Algunos de estos anticuerpos han sido incorporados en diversos ensayos tipo ELISA para ser usados en el análisis del contenido en gluten de los alimentos<sup>8-10</sup>. Estos métodos son los más convenientes y extensamente empleados, al unir sencillez, sensibilidad y economía, además de detectar directamente las proteínas tóxicas para los pacientes celíacos.

Otra de las alternativas, usada principalmente como complementaria a las anteriores, está basada en técnicas de PCR, mediante el uso de cebadores que codifican secuencias repetitivas de las prolaminas<sup>11,12</sup>. A diferencia de los ELISAs, la PCR es una técnica indirecta para detectar proteínas del gluten, además, no cuantifica la presencia de estas proteínas, sino la del ADN que las codifica.

## 2. Seguridad de la avena en la dieta libre de gluten

La introducción de la avena en la dieta libre de gluten ha sido un tema de debate en los últimos años<sup>13,14</sup>. La adherencia a una DSG estricta puede resultar a veces difícil debido a la estrecha gama de ingredientes permitidos y cualquier disminución en las restricciones dietéticas, como es el consumo de avena, puede suponer un alivio para los pacientes celíacos. A nivel nutricional, la avena es una fuente importante de proteínas, grasas, vitaminas, minerales y fibras, y por lo tanto, podría ser beneficiosa para las personas con enfermedad celíaca. Además, la palatabilidad de la avena y su amplia disponibilidad, podrían contribuir a una mayor aceptación de una dieta carente de trigo, cebada y centeno.

La avena se diferencia de otros cereales en su contenido en prolaminas, que representa entre un 10-20% del total proteico, en contraste con el trigo en donde las prolaminas pueden llegar a representar entre el 40-50%. Además, las prolaminas de los distintos cereales varían en tamaño molecular y en el contenido aminoacídico. En la avenina, la proporción de prolinas y glutaminas (aminoácidos abundantes en las regiones tóxicas) es menor que en otros cereales tóxicos (Figura 1).

Janatuinen *et al.*<sup>17</sup> llevaron a cabo el primer ensayo controlado sobre la toxicidad de la avena en la enfermedad celíaca. Desde entonces, varios estudios han evaluado la seguridad del consumo de avena en los pacientes celíacos. Algunos investigadores aseguran que los pacientes celíacos toleran la avena sin signos de inflamación intestinal<sup>14,17,18</sup>, de hecho en muchos países está permitido el uso de avena en alimentos "sin gluten", por ejemplo Gluten-Free Oats®. Por el contrario, existen investigaciones que confirman la toxicidad de la avena en determinados tipos de pacientes celíacos y la imposibilidad de un consumo de avena de manera habitual. Arentz-Hansen *et al.*<sup>15</sup> describieron el deterioro intestinal sufrido por algunos pacientes tras el

consumo de avena y una dieta libre de gluten. Estos pacientes pueden desencadenar una respuesta inmunológica frente a las aveninas, similar a la producida por el gluten de trigo, centeno o cebada. Un estudio dirigido por el Dr. Knut Lundin<sup>19</sup> con un total de 19 celíacos adultos que estuvieron consumiendo 50 gramos de avena diarios durante doce semanas, demostró que uno de los pacientes celíacos incluido en el estudio resultó ser sensible a la avena. La biopsia intestinal mostró una atrofia parcial, que se recuperó considerablemente al dejar de consumir el cereal, pero de nuevo desarrolló una atrofia subtotal y dermatitis aguda al volver a consumir avena. Esto sugiere la necesidad de distinguir grupos de pacientes celíacos en función de su sensibilidad frente a los cereales, e identificar el origen de la inmunogenicidad en los péptidos de las aveninas.

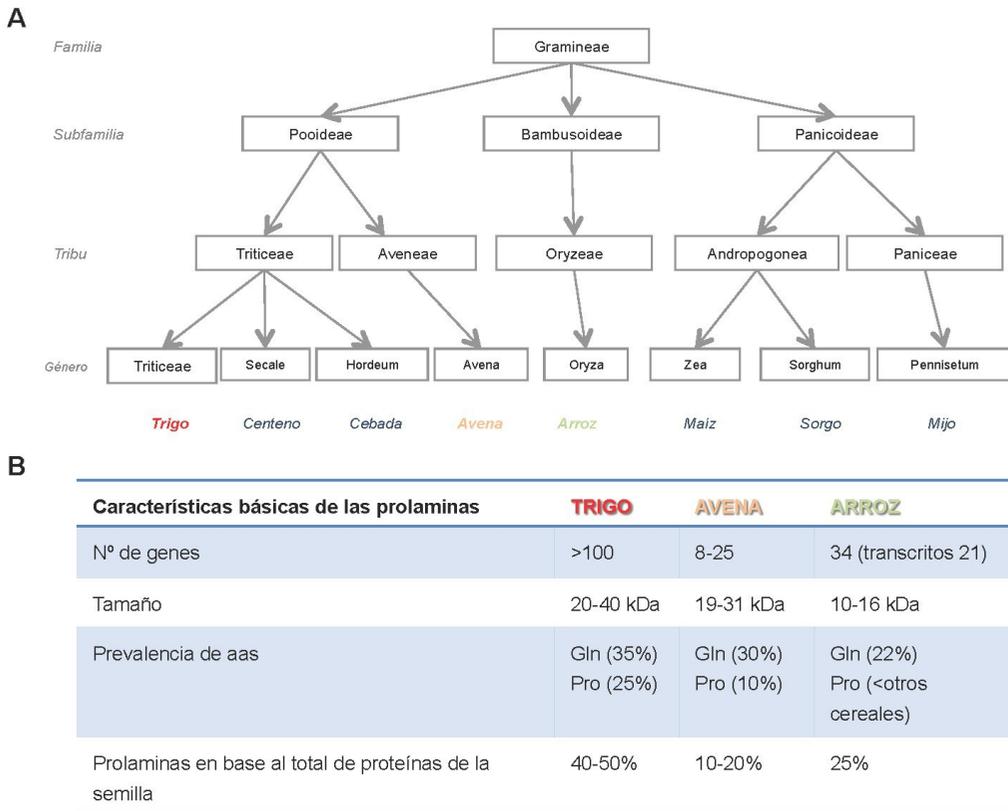


Figura 1. Relación taxonómica y molecular de la avena con otros cereales alimenticios en el contexto de la enfermedad celíaca. A. Taxonomía de la avena en la familia de las gramíneas en relación a cereales tóxicos para los celíacos como el trigo, la cebada y el centeno; y cereales no tóxicos como el arroz, el maíz, el sorgo y el mijo. B. Características moleculares de las prolaminas de trigo, avena y arroz. Modificado según Kagnoff.<sup>16</sup>

Silano *et al.*<sup>20,21</sup> realizaron una serie de ensayos *in vitro* con distintas variedades de avena y comprobaron que todas las variedades objeto de estudio eran tóxicas para los pacientes celíacos, pero existían diferencias en los niveles de toxicidad. Por lo tanto, es crítico aclarar

cualitativa y/o cuantitativamente, el potencial inmunotóxico de la avena, por las evidentes consecuencias clínicas para los pacientes celíacos.

### **2.1. Diversidad en el potencial inmunogénico de diferentes variedades de avena**

Hasta el momento, la diferencia en el tipo de avena usada, la pureza y el diseño del estudio no han permitido una respuesta clara sobre si la avena es segura o no para todos los pacientes celíacos. Además, la avena “pura” (no contaminada), es considerada como libre de gluten según la regulación sobre EC Nº 41/2009. Sin embargo, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación explica las aparentes contradicciones encontradas en investigaciones previas relacionadas con la seguridad de la avena en los pacientes celíacos<sup>21</sup>. En dicho trabajo, demostramos que la inmunogenicidad de la avena varía en función del cultivar empleado.

Se utilizaron 9 variedades de avena de distintas fuentes comerciales australianas y españolas. La pureza del material de avena fue cuidadosamente controlada y mostró estar libre de contaminación. El análisis de los productos de amplificación de ADN confirmó que las muestras de avena no estaban contaminadas con trigo, cebada, centeno o mezclas de estos cereales. La toxicidad de las distintas variedades de avena fue evaluada mediante ensayos inmunológicos con el AcMo G12, un anticuerpo obtenido frente a uno de los péptidos más tóxicos descritos para la enfermedad celíaca, el péptido 33-mer de la  $\alpha$ -2 gliadina. Se distinguieron tres grupos de variedades de avena, en función de su reactividad con el AcMo G12: un grupo con reactividad elevada, un grupo que mostró una reactividad intermedia y otro sin reacción detectable (Figura 2). La potencial inmunotoxicidad de los tres tipos de avena fue evaluada mediante proliferación celular y liberación de interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), utilizando linfocitos T procedentes de sangre periférica de pacientes celíacos. Con ello, se demostró que la reactividad del AcMo G12 frente a las proteínas de almacenamiento de las distintas variedades de avena, estaba correlacionada con los estudios inmunológicos realizados a partir de muestras procedentes de pacientes celíacos. Por tanto, estos resultados dan una explicación racional de por qué sólo determinadas avenas son capaces de desencadenar una respuesta inmunológica en los pacientes celíacos.

La incorporación de algunas variedades de avena en los alimentos libres de gluten, podría no sólo mejorar la calidad nutricional del paciente, sino también podría proporcionar ciertos beneficios en el tratamiento de algunas enfermedades relacionadas con el colesterol, la diabetes o los problemas de tránsito intestinal. Nuestro estudio proporciona nuevos conocimientos sobre el dilema de la avena en la enfermedad celíaca y sugiere métodos prácticos para la selección de aquellas variedades tolerables por los pacientes celíacos.

Dada la importancia de la fuente de avena usada, este trabajo debería ser tenido en cuenta en las normativas sobre seguridad alimentaria, en el etiquetado de productos sin gluten que puedan contener avena, así como en el diseño de ensayos clínicos sobre el efecto de la avena en los pacientes celíacos.

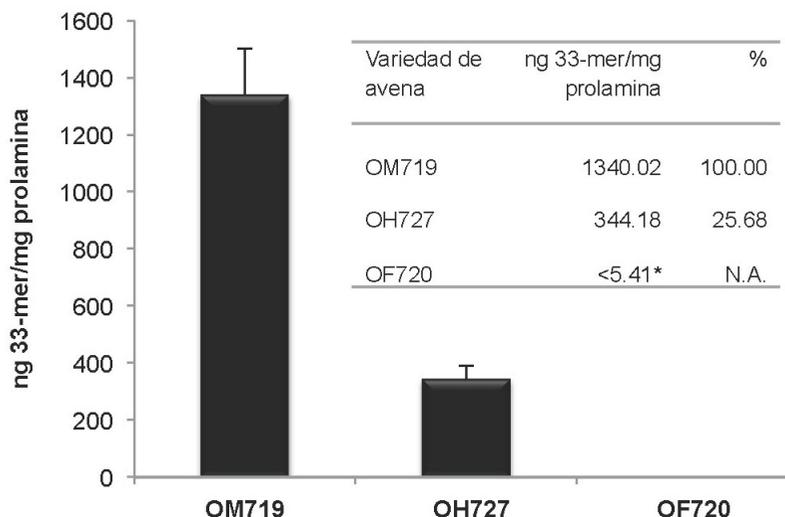


Figura 2. Determinación de la concentración de péptido 33-mer en diferentes variedades de avena. La concentración de péptido 33-mer se determinó mediante ELISA competitivo utilizando el G12-HRP. OM719, OH727, OF720: variedades de avena. %: Porcentaje de 33-mer en cada variedad con respecto a la más reactiva, OM719. \*Concentración de 33-mer inferior al límite de cuantificación del ensayo (5,4 ng/mL). N.A.: No aplicable. Modificado según Comino et al.<sup>21</sup>

### 3. Variación natural en la inmunotoxicidad de variedades de cebada cultivables y silvestres

El cumplimiento de la DSG presenta muchas veces dificultades debido a ingestas inadvertidas, pero especialmente, debido a transgresiones voluntarias, ya sean por desconocimiento del paciente ante las consecuencias de la ingesta de gluten, por sucumbir a la tentación de ingerir comidas no permitidas en la dieta pero altamente apetecibles, o por la presión social que supone tener que demandar un tratamiento especial a la hora de comer. Como consecuencia de ello, distintas estrategias han sido propuestas con el objetivo de conseguir nuevas terapias capaces de ayudar a la DSG<sup>22-25</sup>. Una posible alternativa se basa en la identificación de nuevas variedades de cereales con perfiles de toxicidad reducida, lo que podría contribuir a la mejora de la calidad y variedad de los alimentos destinados al colectivo celíaco. En el caso de la avena, los estudios inmunológicos realizados revelaron que determinadas variedades no presentaban toxicidad para los pacientes celíacos<sup>21</sup>. También se ha analizado la posible inmunogenicidad de distintas variedades de trigo mediante anticuerpos frente a péptidos inmunogénicos del trigo y reactividad de células T de individuos celíacos<sup>6</sup>. Sin embargo, se desconoce si todas las variedades de cebada son igualmente tóxicas para los pacientes celíacos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha estudiado la toxicidad de diferentes líneas de cebada, investigando variedades de *Hordeum vulgare*, una cebada cultivable, y variedades de *Hordeum chilense*, una cebada silvestre, utilizada para el desarrollo de nuevos cereales cultivables.

La cebada es un importante cereal de cultivo, usado principalmente para la alimentación, obtención de la malta y para la elaboración de cervezas y bebidas destiladas. En los últimos años el consumo de cebada se ha visto aumentado, en gran parte debido a su alto valor nutricional. Las semillas de cebada aportan carbohidratos complejos (principalmente almidón), minerales, vitaminas, y fibra, lo que proporciona beneficios en la reducción del colesterol sanguíneo. Además, el alto contenido en fibra y otros componentes tienen un efecto saciante, lo que puede afectar positivamente en el control del peso, así como en la mejora del tránsito intestinal<sup>26,27</sup>.

En nuestro estudio se compara por primera vez las diferencias en los niveles de toxicidad entre distintas variedades de cebada<sup>28</sup>. Se realizó un riguroso control de la pureza de las muestras tanto mediante examen visual, como por técnicas de PCR, y seguidamente, el patrón de bandas de hordeína fue analizado mediante MALDI-TOF MS. Los resultados obtenidos revelaron que existía un mayor número de bandas de hordeínas para el caso de las variedades silvestres. Estas diferencias en el espectro de masas podrían estar relacionadas tanto con propiedades funcionales de la semilla, como con la toxicidad de las líneas, en relación con la enfermedad celíaca.

El perfil de toxicidad de las distintas variedades fue evaluado mediante técnicas inmunológicas basadas en el AcMo G12, mientras que la proliferación celular y liberación de IFN- $\gamma$  se utilizaron como índices de activación inmunológica. Los resultados obtenidos mediante técnicas inmunológicas G12 mostraron grandes diferencias entre las líneas de *H. vulgare* y *H. chilense*, siendo las líneas de cebada silvestre las más inmunogénicas. Así mismo, diferencias en el potencial inmunotóxico fueron encontradas entre variedades de una misma especie de cebada (Figura 3).

La capacidad estimuladora de estas variedades de cebada fue evaluada mediante proliferación celular y liberación de IFN- $\gamma$  a partir de sangre periférica y mucosa intestinal de pacientes celíacos activos. Todas las variedades de cebada fueron capaces de estimular la secreción de IFN- $\gamma$ , tanto a nivel de sangre periférica, como de mucosa intestinal. No obstante, una de las variedades silvestres fue la que mostró una mayor actividad en relación con la patogénesis de la enfermedad celíaca.

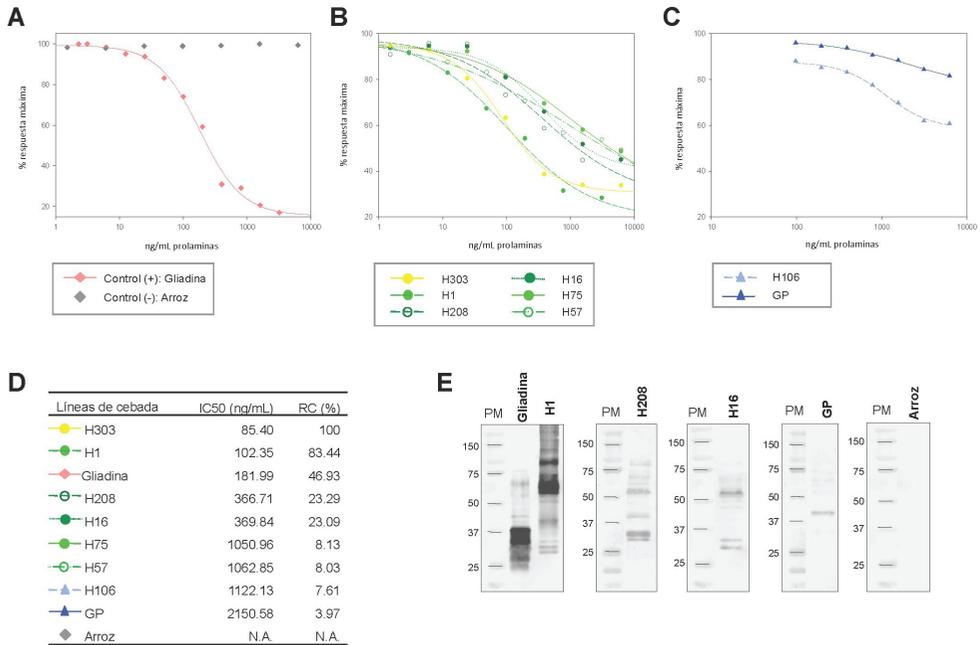


Figura 3. Afinidad relativa del AcMo anti-gliadina 33-mer G12 frente a diferentes líneas de cebada. (A, B, C y D) ELISA competitivo G12 para determinar la afinidad relativa de este anticuerpo frente a las diferentes líneas de cebada. Como control positivo y negativo se usó gliadina y arroz, respectivamente. (E) Western blot G12 de las prolaminas de las diferentes líneas de cebada. Las membranas fueron reveladas con el AcMo G12. PM, peso molecular (kDa). IC50: concentración de antígeno con la que se obtiene una reducción del 50% de la señal máxima. RC: Reactividad cruzada. Modificado según Comino et al.<sup>28</sup>

Se ha establecido una correlación entre la especie de cebada utilizada y su inmunotoxicidad para pacientes celíacos. Se ha demostrado que las variedades de cebada cultivables, aunque con diferencias entre ellas, presentan menores niveles de gluten tóxico que las silvestres. Estos hallazgos podrían ayudar al desarrollo de nuevas líneas con bajos niveles de gluten, que puedan ser destinadas a la elaboración de alimentos y bebidas con cantidades de gluten que estén por debajo del umbral permitido para los pacientes celíacos. Así por ejemplo, durante la elaboración de la cerveza se puede disminuir miles de veces la cantidad inicial de péptidos tóxicos, en los distintos procesos de extracción y fermentación<sup>29</sup>. Las variedades de cebada con inmunotoxicidad reducida<sup>28</sup>, podrían ser incluidas en programas de mejora genética dirigidos al desarrollo de variedades que pudieran servir de materia prima para la elaboración de cervezas libres de péptidos tóxicos, ya que la cantidad de material tóxico de partida podría ser inferior usando variedades seleccionadas.

La incorporación de un germoplasma silvestre en programas de cultivo, es una práctica común para ampliar la base genética de las especies cultivadas. Sin embargo, hay que tener cuidado de no aumentar la toxicidad de las variedades cultivadas, como en el caso de la cebada, ya que, según los resultados obtenidos por Comino et al.<sup>28</sup>, las variedades silvestres pueden contener mayores niveles de gluten tóxico que las variedades cultivadas.

## **4. Conclusiones**

La dieta libre de gluten es actualmente el único tratamiento para los pacientes celíacos, por tanto, es fundamental la caracterización y cuantificación de la fracción tóxica del gluten en los alimentos y materias primas destinadas al colectivo celíaco. Existe un amplio rango de variabilidad en el potencial inmunotóxico de distintas variedades de cereales. Además, se ha demostrado que no hay una correlación estricta entre la cantidad de gluten y el potencial inmunotóxico, debido al hecho de que algunos epítomos del gluten pueden ser menos inmunogénicos que otros y, por lo tanto, necesitan una mayor concentración para provocar un efecto tóxico equivalente.

Para el caso de la avena, se ha comprobado que la inmunogenicidad de la misma varía en función del cultivar empleado, encontrándose variedades inocuas para los pacientes celíacos, lo que podría suponer un enriquecimiento de la DSG. Así mismo, se ha demostrado que las variedades de cebada cultivables, aunque con diferencias entre ellas, presentan menores niveles de gluten tóxico en comparación con las silvestres. Este hecho resulta importante en los programas de selección de especies cultivables y a la hora de la elaboración de determinados alimentos y/o bebidas que proceden de cereales tóxicos, como es el caso de las cervezas.

## Referencias

1. Kupper C. *Dietary guidelines and implementation for celiac disease*. Gastroenterol. 2005; 128: S121-7. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.024>
2. Green PH, Jabri B. *Coeliac disease*. Lancet. 2003; 362: 383-91. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14027-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14027-5)
3. Camafeita E, Alfonso P, Mothes T, Méndez E. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: The first non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples*. J. Mass Spectrom. 1997; 32: 940-47. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199709\)32:9<940::AID-JMS550>3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199709)32:9<940::AID-JMS550>3.0.CO;2-2)
4. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Méndez E, Mothes T. *A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins*. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2001; 13: 1189-93. <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200110000-00011>
5. Doña V, Urrutia M, Bayardo M, Alzogaray V, Goldbaum FA, Chirido FG. *Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions*. J. Agric. Food Chem. 2010; 58: 918-26. <http://dx.doi.org/10.1021/jf902973c>
6. Spaenij-Dekking EH, Kooy-Winkelaar EM, Nieuwenhuizen WF, Drijfhout JW, Koning F. *A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of alpha/beta- and gamma-gliadin*. Gut. 2004; 53: 1267-73. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2003.037952>
7. Mitea C, Kooy-Winkelaar Y, van Veelen P, de Ru A, Drijfhout JW, Koning F et al. *Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome*. Am. J. Clin. Nutr. 2008; 88: 1057-66.
8. Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, López MC et al. *Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide*. PLoS One. 2008; 3: e2294. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002294>
9. Morón B, Cebolla A, Manyani H, Alvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas MC, et al. *Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide*. Am. J. Clin. Nutr. 2008; 87: 405-14.
10. Méndez E, Vela C, Immer U, Janssen FW. *Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food*. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 2005; 17: 1053-63. <http://dx.doi.org/10.1097/00042737-200510000-00008>
11. Henterich N, Osman AA, Méndez E, Mothes T. *Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction*. Nahrung. 2003; 47: 345-48. <http://dx.doi.org/10.1002/food.200390079>
12. Hernández M, Esteve T, Pla M. *Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat*. J. Agric. Food Chem. 2005; 53: 7003-9. <http://dx.doi.org/10.1021/jf050797j>

13. Koskinen O, Villanen M, Korponay-Szabo I, Lindfors K, Mäki M, Kaukinen K. *Oats not induce systematic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease*. J. Pediatric Gastroenterol. Nutr. 2009; 48: 559-65. <http://dx.doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181668635>
14. Pulido OM, Gillespie Z, Zarkadas M, Dubois S, Vavasour E, Rashid M, Switzer C *et al*. *Introduction of oats in the diet of individuals with celiac disease: a systematic review*. Adv. Food Nutr. Res. 2009; 57: 235-85. [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)57006-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(09)57006-4)
15. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg Ø, Scott H, Koning F, Jung G *et al*. *The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease*. PLoS Medic. 2004; 1: 84-92. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0010001>
16. Kagnoff MF. *Overview and pathogenesis of celiac disease*. Gastroenterol. 2005; 128: S10-18. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.008>
17. Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Kempainen TA, Kosma VM, Järvinen RM, Uusitupa MI *et al*. *A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease*. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 1033-37. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199510193331602>
18. Thompson T. *Oats and the gluten-free diet*. J Am Diet Assoc. 2003; 103:376-9. <http://dx.doi.org/10.1053/jada.2003.50044>
19. Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, Løberg EM, Gjøen A, Bratlie J *et al*. *Oats induced villous atrophy in coeliac disease*. Gut. 2003; 52: 1649-52. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.52.11.1649>
20. Silano M, Di Benedetto R, Maialetti F, De Vincenzi A, Calcaterra R, Cornell HJ *et al*. *Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes*. Scand. J. Gastroenterol. 2007; 42: 1302-5. <http://dx.doi.org/10.1080/00365520701420750>
21. Comino I, Real A, de Lorenzo L, Cornell H, López-Casado MÁ, Barro F *et al*. *Diversity in oat potential immunogenicity: Basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease*. Gut. 2011; 60: 915-20. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.2010.225268>
22. Sollid LM, Khosla C. *Novel therapies for coeliac disease*. J. Intern. Med. 2011; 269: 604-13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02376.x>
23. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS *et al*. *Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2009; 106: 16799-804. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906773106>
24. Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, Sollid LM, Barro F. *Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010; 107: 17023-28. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007773107>
25. Daveson AJ, Jones DM, Gaze S, McSorley H, Clouston A, Pascoe A, *et al*. *Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease-a randomised double-blinded placebo controlled trial*. PLoS One. 2011; 6: e17366. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017366>
26. Baik BK, Ullrich SE. *Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest*. J. Cereal Science. 2008; 48: 304-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.002>
27. Finnie C, Svensson B. *Barley seed proteomics from spots to structures*. J. Proteomics. 2009; 72: 315-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2008.12.001>

28. Comino I, Real A, Gil-Humanes J, Pistón F, de Lorenzo L, Moreno ML, *et al.* *Significant differences in potential immunotoxicity of barley varieties for celiac disease.* *Molecular Nutrition and Food Research.* 2012; 56: 1697-707.  
<http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200358>
29. Dostálek P, Hochel I, Méndez E, Hernando A, Gabrovská D. *Immunochemical determination of gluten in malts and beers.* *Food Add. Contam.* 2006; 11: 1074-78.  
<http://dx.doi.org/10.1080/02652030600740637>