

Los anticuerpos IgA anti-transglutaminasa de pacientes celíacos reconocen mayoritariamente epitopes conformacionales

Aleanzi, Mabel C.

Cátedra de Bioquímica Básica de Macromoléculas - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral - Paraje El Pozo.CC 272
3000.Santa Fe,Argentina. e.mail: maleanzi@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: La IgA anti-transglutaminasa es un marcador específico para el diagnóstico de la enfermedad celíaca. La transglutaminasa de tejido es una enzima alostérica cuyos cambios conformacionales están mediados por calcio. Se sensibilizaron microplacas de ELISA, utilizando como antígenos de captura la enzima de cobayo en su forma nativa, inmovilizada en presencia de calcio (a), o en ausencia de calcio (b), y la enzima desnaturalizada (c). Las absorbancias promedio de la IgA, obtenidas de la evaluación de sueros de pacientes celíacos (n=20) frente a la enzima inmovilizada en las mencionadas condiciones resultaron: 1.3 UA (a), 0.56 UA (b) y 0.33 UA (c). El número de sueros de pacientes celíacos que resultaron positivos sobre el total, fueron respectivamente: 20/20 (a), 18/20 (b) y 6/20 (c). Los resultados sugieren la prevalencia de anticuerpos contra epitopes conformacionales en sueros de pacientes celíacos, aspecto que debe ser tenido en cuenta, cuando se la utiliza como antígeno de captura en ensayos de ELISA.

Palabras clave: IgA anti-tTG, epitopes conformacionales, ELISA.

SUMMARY: IgA antibodies against tissue transglutaminase from celiac patients mostly recognise conformational epitopes. Aleanzi, Mabel Cristina . IgA anti-transglutaminase is a specific marker for the diagnosis of celiac disease. Tissue transglutaminase is an allosteric enzyme undergoing conformational changes mediated by calcium. ELISA microplates were coated with guinea pig transglutaminase, using the native enzyme, immobilized in the presence (a) or absence (b) of calcium and the denaturated enzyme (c) as capture antigens. Mean absorbance values obtained after evaluating IgA in sera from celiac patients (n=20) against the enzyme immobilized under the conditions mentioned above were: 1.3 AU (a), 0.56 AU (b) and 0.33 AU (c). Positive/total sera ratios were: 20/20 (a), 18/20 (b) and 6/20 (c). These results suggest that antibodies against conformational epitopes clearly prevail in celiac disease patients. This characteristic must be taken into account when the enzyme is used as capture antigen in ELISA assays.

Key words: Anti-transglutaminase IgA - celiac disease - conformational epitopes - ELISA.

Introducción

La enfermedad celíaca se caracteriza por el daño que se produce en intestino delgado, con pérdida de vello e hiperplasia de las criptas, lo que conduce a malabsorción. Existe una predisposición genética, fuertemente asociada con HLA-DQ2 (a1*0501-b1*0201). La patología se desencadena a partir de la ingestión de proteínas presentes en el gluten de trigo (gliadinas) y cereales relacionados. La biopsia de intestino delgado, con demostración de mucosa plana, que se revierte con la eliminación

del gluten de la dieta es considerada la prueba de referencia para el diagnóstico de la enfermedad.

Los ensayos serológicos ampliamente utilizados para el diagnóstico de la enfermedad celíaca son la determinación de anticuerpos anti-gliadina, y de autoanticuerpos antiendomiso (AE). Particularmente la IgA AE demostró ser un marcador altamente sensible y específico (1, 2). Estos autoanticuerpos se evalúan sobre cortes histológicos de tejidos, esófago de mono o más recientemente, cordón umbilical humano (3).

En 1997, Dieterich y colaboradores (4) identificaron a la transglutaminasa de tejido (tTG), como el antígeno blanco principal de los autoanticuerpos. Simultáneamente estos autores efectuaron, sobre un panel reducido de pacientes, la primera determinación por ensayo de ELISA de los anticuerpos anti-tTG, utilizando como antígeno de captura la enzima de cobayo. En 1998, Dieterich y colaboradores (5) corroboraron la validez del ensayo de determinación de la IgA anti-tTG como predictora de la enfermedad celíaca. Estos autores encontraron una elevada sensibilidad, del 98 % con una especificidad del 94 % y una excelente correlación con la IgA AE.

Sulkanen y cols en 1999 (6) compararon la reactividad de la IgA de pacientes celíacos frente a la enzima de cobayo inmovilizada en ausencia y presencia de calcio, y solo en este último caso encontraron que había una clara diferencia de señal entre la reactividad de pacientes celíacos y controles. Como la actividad transglutaminasa de la enzima es activada por calcio, esta diferencia de reactividad se atribuyó a una mayor exposición de epitopes funcionales en presencia de calcio.

Numerosos estudios demostraron una elevada sensibilidad y especificidad de la determinación de los anticuerpos anti-tTG por ensayo de ELISA y su correlación con los los AE (7,8,9). La utilización de la enzima recombinante humana como antígeno de captura arrojó resultados de sensibilidad y especificidad elevados, (98 %) (10), comparables y en algunos casos superiores a los obtenidos con la enzima comercial de cobayo, particularmente en relación a la mayor especificidad del antígeno de origen humano (11, 12). En estos estudios no se profundizó en el análisis de las características, lineales o conformacionales de los epitopes reconocidos por los anticuerpos anti-tTG.

La evaluación de la reactividad de anticuerpos de pacientes celíacos frente a la enzima funcionalmente activa, y frente a la enzima desnaturalizada es un dato importante que puede contribuir a reforzar la hipótesis sugerida por Sulkanen y cols.(6) de que los anticuerpos de pacientes celíacos reconocerían epitopes de la enzima funcionalmente activa.

En este trabajo comparamos la respuesta de la IgA anti-tTG de sueros de pacientes celíacos y controles sanos, en ensayos de ELISA, en los que las microplacas fueron sensibilizadas con la enzima

comercial de cobayo en distintas condiciones: soluciones de la enzima funcionalmente activa (en las que se controló su actividad enzimática específica), con o sin adición alternativa de calcio en la etapa de incubación y soluciones de la enzima desnaturalizada por calor.

Materiales y Métodos

Pacientes. Los sueros de pacientes celíacos y controles no celíacos utilizados en este trabajo corresponden a un grupo de sueros estudiados previamente (13), los que se mantuvieron congelados a -20°C. Los pacientes celíacos fueron diagnosticados en el Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños de Santa Fe, Dr. Orlando Alassia, según el siguiente criterio: evaluación clínica; estudios de laboratorio incluyendo anticuerpos anti-gliadina; biopsia de intestino delgado, con resultado de enteropatía grado III-IV. previo al tratamiento; evolución favorable con dieta libre de gluten. Los sueros analizados corresponden a la extracción previa al tratamiento con dieta libre de gluten. Los sueros considerados controles no celíacos corresponden a pacientes que fueron diagnosticados clínicamente como no celíacos, negativos para los anticuerpos anti-gliadina, pero que no fueron biopsiados. Sexo de los pacientes celíacos : 60/40, F/M. Sexo de los pacientes controles 50% F/M.. Edad media de los pacientes: tres años.

Transglutaminasa de cobayo. Se utilizó la transglutaminasa (EC 2.3.2.13) de cobayo Sigma (T5398). El contenido de cada vial (conteniendo 1 UI de enzima), se disolvió con 500 µl de solución de Tris-acetato 0.05 M, pH 6, EDTA (etilén-diamino tetraacético) 2 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM. Una alícuota de esta solución se desnaturalizó por incubación 60 minutos a 55 °C. Se determinaron las actividades enzimáticas y concentración de proteínas de la fracción nativa, (EN) y la desnaturalizada por calor (ED).

Determinación de la actividad específica de la transglutaminasa. Se efectuó por el ensayo de formación de hidroxamato descripto por Folk (14). Como aceptor del grupo amino, se utilizó el dipéptido glutaminil-glicidín, con el amino terminal protegido por el grupo carbobenzoxi (CBZ): CBZ-L-glutaminil-

glicina, y como grupo donante, la hidroxilamina. Para detener la reacción y desarrollar color se utilizó el reactivo FeCl_3 -tricloroacético. El hidroxamato que se genera como producto se determinó por lectura espectrofotométrica. El ensayo se adaptó a microtécnica. La reacción se desarrolló en un volumen total de 100 μl ., por 60 min a 37 °C, al cabo de los cuales se adicionó el reactivo de color y se centrifugó 2 minutos a 10.000 RPM. en microcen-trífuga. Doscientos microlitros del sobrenadante se transfirieron a microplacas de ELISA. La absorbancia se leyó a 490 nm en lector de ELISA. La curva de calibrado se construyó utilizando γ -glutamil hidroxamato (Sigma) como testigo.

La determinación del contenido proteico se efectuó por el método de Bradford (15) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Unidad de actividad. Se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de hidroxamato por minuto, a partir de CBZ-glutaminiil-glicidin dipéptido, a 37 °C en las condiciones del ensayo.

La actividad enzimática específica (Aee) se calculó como:

$$\text{Aee} = \frac{\text{Unidades de actividad /ml de muestra enzimática}}{\text{mg de proteínas /ml de muestra enzimática}}$$

Ensayos de ELISA. Se efectuaron de acuerdo con lo descrito en (13). Las microplacas de poliestireno (Costar, fondo plano) fueron incubadas 2 horas a 37°C y ON a 4°C con 50 μl de la solución correspondiente de la tTG de cobayo: 0,005 mg/ml en Tris 0.05 M, pH 7.5 con o sin adición de CaCl_2 20 mM. Los sitios residuales se bloquearon, por incubación durante 1 hora a 37°C con TBS (Tris 0.05 M pH 7.5, NaCl_2 0.15 M) adicionado de albúmina sérica bovina 10 g/l (TBS-BSA). Las muestras de suero se diluyeron 1/100 en TBS-BSA. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgA-peroxidasa, específico de cadena alfa.humana (Sigma). La reacción de color se desarrolló con los sustratos TMB (3-3',5-5' tetrametil- bencidina) y agua oxigenada, se detuvo por el agregado de ácido sulfúrico 2 N y se midió la absorbancia a 450 nm.

Análisis estadístico. Para calcular los intervalos de confianza y comparar las diferencias entre las absorbancias medias obtenidas frente a cada enzi-

ma y para ambos grupos de pacientes se utilizó el test t de Student (dos grupos independientes).

Resultados

La actividad enzimática específica de la enzima nativa (EN) determinada inmediatamente luego de reconstituída resultó igual a 1.2 UI/mg. La enzima sometida a tratamiento térmico (ED) no mostró actividad. Ambas enzimas fueron adsorbidas desde soluciones de igual concentración de proteínas (0.005 mg/ml).

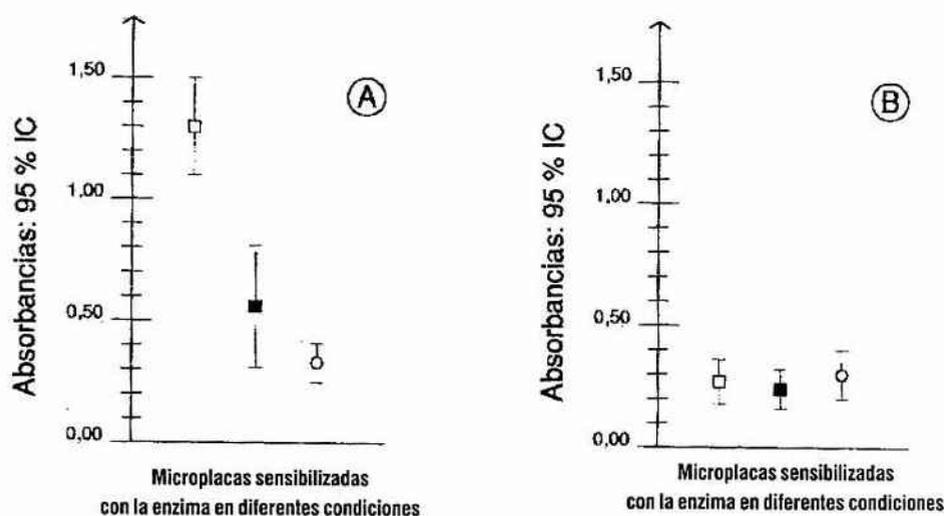
Como se muestra en la Figura 1-A, para los pacientes celíacos la mayor respuesta de la IgA se obtuvo frente a la enzima activa, inmovilizada en medio con calcio. Esta respuesta disminuyó significativamente ($p < 0.01$) cuando la enzima fue adsorbida en ausencia de calcio y se obtuvo una disminución drástica de la señal (mayor al 50 %) frente a la enzima desnaturalizada.

Los sueros de controles no celíacos (Figura 1-B) no mostraron diferencias de absorbancias significativas frente a la enzima inmovilizada en distintas condiciones

Las absorbancias promedio de los pacientes celíacos fueron significativamente mayores que las de los controles no celíacos frente a la enzima activa, tratada con calcio ($p < 0.001$) y sin tratar ($p < 0.01$). Pero no se observó diferencia significativa cuando se compararon las respuestas de celíacos y controles frente a la enzima desnaturalizada. Esta falta de diferencia no se debió a un aumento de la respuesta inespecífica frente a la enzima desnaturalizada que se mantuvo baja, sino a una disminución de la respuesta específica de los sueros de pacientes celíacos en relación a la obtenida frente a la enzima nativa.

Como criterio de corte para este marcador se consideraron positivas las absorbancias que superaron el intervalo de confianza de la absorbancia promedio de los controles no celíacos. Como se muestra en la Tabla 1, todos los pacientes celíacos estudiados resultaron positivos frente a la tTG nativa tratada con calcio y 18/20 resultaron positivos frente a la enzima nativa sin tratar con calcio. Cuando se utilizó la enzima desnaturalizada, solo 6/20 sueros de pacientes celíacos arrojaron respuestas positi-

Figura 1: Respuesta de la IgA anti-TTG frente a la enzima inmovilizada en diferentes condiciones.



Absorbancias medias de la IgA con sus intervalos del 95 % de confianza frente a la enzima nativa inmovilizada en presencia: □ y ausencia: ■ de calcio y frente a la enzima desnaturalizada por calor: ○ (sensibilizada en presencia de calcio) **A)** n= 20 pacientes celíacos sin tratar; **B)** 20 pacientes no celíacos.

Tabla 1: Número de sueros que resultaron positivos frente a la enzima inmovilizada en distintas condiciones

	Enzima utilizada como antígeno		
	Nativa + calcio	Nativa sin calcio	Desnaturalizada
Pacientes celíacos	20/20	18/20	6/20
Controles no celíacos	0/20	0/20	0/20

vas, aunque con valores muy inferiores en relación con los obtenidos frente a la enzima nativa.

Conclusiones y Discusión

La determinación de la IgA anti-tTG se realizó utilizando microplacas adsorbidas con iguales con-

centraciones en masa de enzimas que presentaban distintas actividades específicas. Estas distintas actividades específicas no se debían a una diferente proporción de enzima/proteínas totales, sino a la presencia de la misma cantidad de enzima con distintos estados de actividad, que pueden asociarse a distintos estados conformacionales.

La transglutaminasa de tejido cumple diversas funciones y además de la actividad transglutaminasa-

desamidasa calcio dependiente, es el único miembro de la familia que exhibe una actividad adicional diferente: puede unir e hidrolizar guanosina y adenosina trifosfato (GTP, ATP) (16), e hidrolizar ADN (17). La actividad hidrolítica es independiente de la actividad transglutaminasa, no es Ca^{++} , sino Mg^{++} dependiente. El GTP y el calcio, controlan el cambio estructural entre dos actividades vitales y mutuamente excluyentes de la tTG. Este cambio de función se produce en virtud de cambios conformacionales en los que participan ambos dominios III y IV de la enzima (18).

Sulkanen y cols. (6) utilizando enzima de cobayo y Sardy y cols (10) utilizando enzima recombinante humana, demostraron una mayor reactividad de los sueros de pacientes celíacos frente a la enzima inmovilizada en presencia de calcio, (que activa la función transglutaminasa-desamidasa). En este trabajo encontramos resultados coincidentes, ya que la absorbancia promedio y el número de sueros de pacientes celíacos considerados positivos fue mayor frente a la enzima nativa inmovilizada en presencia de calcio, que en su ausencia.

No se encontraron referencias en las que se evalúe la reactividad frente a la enzima desnaturalizada. Nuestros resultados indican una drástica disminución de la señal con pérdida de sensibilidad, ya que solo 6 de los 20 pacientes estudiados resultaron positivos frente a la enzima inactivada. Se sabe que la enzima es inestable térmicamente y que disminuye su actividad cuando aumenta el tiempo de almacenamiento (10,14). Comprobamos (resultados no mostrados) que también pierde actividad si se somete a procesos de congelamiento y descongelamiento una vez resuspendido el liofilizado. Esta variación de la actividad provocó pérdida de reactividad y resultados no siempre reproducibles de absorbancias.

En virtud de que la prueba de referencia para el diagnóstico sigue siendo la biopsia, la sustitución de la misma por una prueba no invasiva, como la determinación de la IgA AE sería de gran utilidad. Con mayores ventajas, tanto de tipo éticas (ya que no utilizan tejido de animales superiores), como de reproducibilidad del ensayo, ya que resultan independiente del criterio del observador, aparecen los ensayos de anticuerpos anti-tTG por ELISA. Wong y colaboradores (11) compararon el funcionamiento de diferentes kits comerciales de ELISA, basados en

la utilización de la enzima de cobayo o la humana recombinante, con la determinación de los anticuerpos AE. Se concluyó que si bien la enzima de origen humano podría arrojar resultados superiores, particularmente de especificidad, un solo kit mostró el 100% de sensibilidad y especificidad. Los autores sugirieron que las diferencias de resultados entre los distintos tests podrían surgir de la presencia de anticuerpos contra epitopos conformacionales.

En este trabajo demostramos que cuando la enzima que se utiliza se encuentra totalmente desnaturalizada, se produce una drástica disminución de la reactividad con relación a la obtenida con la enzima activa. Estos resultados, y los estudios más finos realizados por Sblattero y cols. (19), contribuyen a reforzar esa hipótesis y sugieren que la optimización futura de estos ensayos debería centrarse no solo en el origen, ya sea animal o humano, y en el grado de pureza de la enzima utilizada como antígeno sino también en la preservación de su conformación funcional activa. Además de considerar los posibles efectos que la inmovilización podría promover sobre la presentación de los epitopos, una primera condición que debería controlarse, particularmente cuando no se utilizan kits estandarizados, es que la enzima se encuentre en solución, en el estado funcionalmente activo, calcio dependiente.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con fondos del Programa CAI+D 2000, de la Universidad Nacional del Litoral.

Bibliografía

- 1- Walker-Smith JA, Guadalinì S, Schmitz J, Schmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease: Report of Working Group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch. Dis. Child* 1990; 65: 909-11.
- 2- Maki M. The humoral immune system in coeliac disease. *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 1995; 9:231-49.
- 3- Volta U, Molinaro N, de Franceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA anti-endomisial antibodies on human umbilical cord tissue for coeliac disease screening. Save both money and

- monkeys *Digestive Disease Science* 1995; 40:1902-5.
- 4- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* 1997; 3: 797-801.
- 5- Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillet H, Riecken EO, Schuppan D. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 1317-21.
- 6- Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Maki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 1322-8.
- 7- Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R, Salerno G, Salvatore F, Sacchetti L. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac disease. *J Pediatr* 1999; 134: 166-71.
- 8- Gillett HR, Freeman HJ. Comparison of IgA endomysium antibody and IgA tissue transglutaminase antibody in celiac disease. *Can J Gastroenterol* 2000;14:668-71.
- 9- Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Litwin CM, Hill HR. IgA antibodies against endomysium and transglutaminase: A comparison of methods. *J Clin Lab Anal* 2001;15 :108-11.
- 10- Sardy M, Odenthal U, Kárpáti S, Paulsson M, Smyth N. Recombinant human tissue transglutaminase ELISA for the diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Clinical Chemistry* 1999; 45:2142-9.
- 11- Wong RC, Wilson RJ, Steele RH, Radford-Smith G, Adelstein S. A comparison of 13 guinea pig and human anti-tissue transglutaminase antibody ELISA kits. *J Clin Pathol*. 2002; 55:488-94.
- 12- Wolters V, Vooijs-Moulaert AF, Burger H, Brooimans R, De Schryver J, Rijkers G, Houwen R. Human tissue transglutaminase enzyme linked immunosorbent assay outperforms both the guinea pig based tissue transglutaminase assay and anti-endomysium antibodies when screening for coeliac disease. *Eur J Pediatr*. 2002 May;161:284-7.
- 13- Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggener M. Celiac Disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clinical Chemistry* 2001; 47: 2023-8.
- 14- Folk JE and Cole PW. Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitors studies. *Biochim Biophys Acta* 1966; 122: 244-64.
- 15- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- 16- Lai TS, Slaughter TF, Koropchak CM, Haroon ZA, Greenberg ChS. C-terminal deletion of human tissue transglutaminase enhances magnesium-dependent GTP/ATPase activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 31191-5.
- 17- Takeuchi Y, Ohashi H, Birckbichler PJ, Ikejima T. Nuclear translocation of tissue type transglutaminase during sphingosine induced cell death: a novel aspect of the enzyme with DNA activity. *Z Naturforsch* 1998; 53c: 352-8.
- 18- Monsonego A, Friedmann I, Shani Y, Eisenstein M, Schwartz M. GTP-dependent conformational changes associated with the functional switch between Galpha and cross-linking activities in brain-derived tissue transglutaminase. *J Mol Biol* 1998; 282:713-20.
- 19- Sblattero D, Florian F, Azzoni E, Zyla T, Park M, Baldas V, Not T, Ventura A, Bradbury A, Marzari R. The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. *Eur J Biochem*. 2002 ;269:5175-81.