

Nuove Tecnologie Alimentari del Senza Glutine

Carmen Gianfrani

Istituto di Biochimica delle Proteine, CNR, Napoli

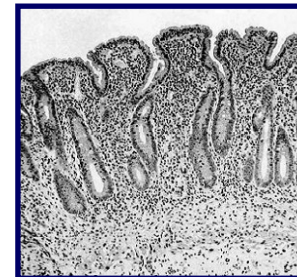
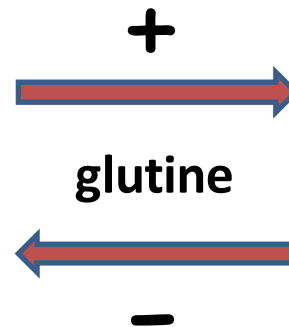
c.gianfrani@ibp.cnr.it



La celiachia è una malattia complessa multifattoriale
ma con un unico agente responsabile:
le proteine del glutine



mucosa normale



mucosa celiaca

Terapia attuale: **dieta senza glutine**

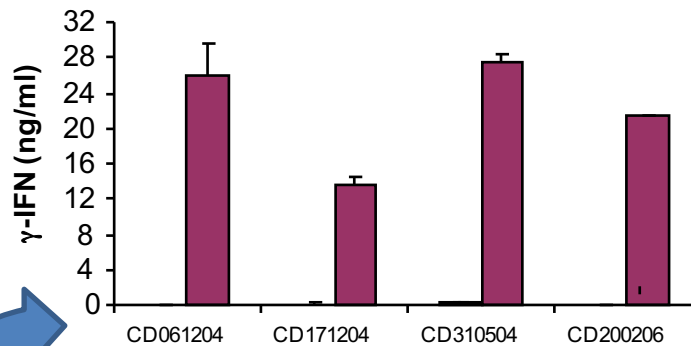
Assoluta, da seguire per la vita

- ✓ Sicura
- ✓ Qualità della vita compromessa (alimentazione fuori casa)

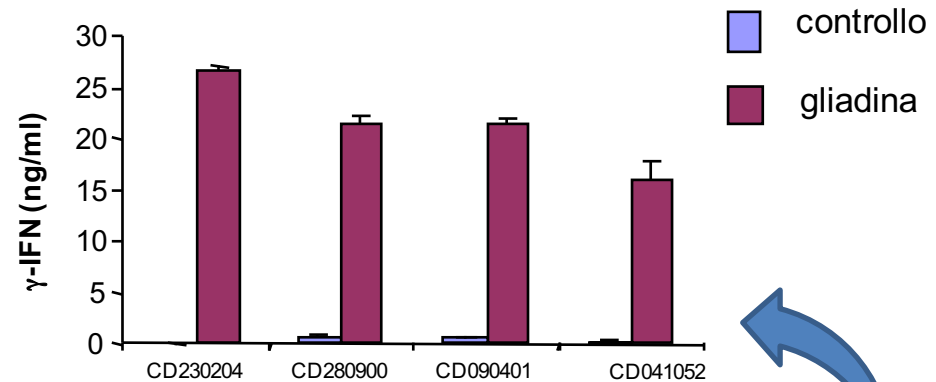


La dieta a causa della presenza di linfociti T pro-infiammatori reattivi al glutine con memoria immunologica nella mucosa celiaca

Celiaci con mucosa atrofica



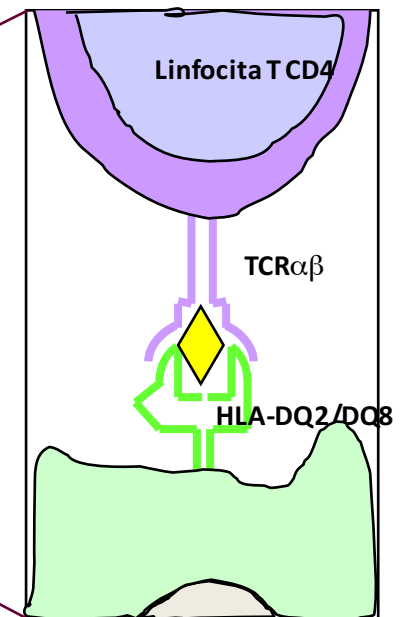
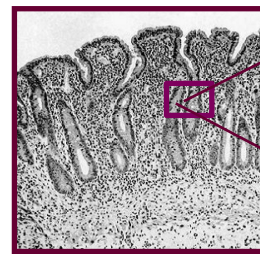
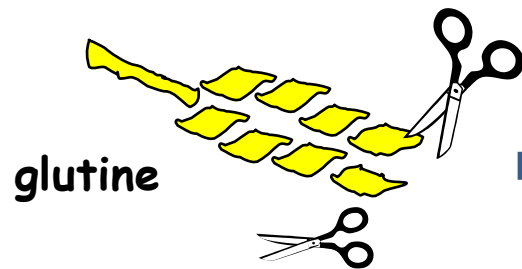
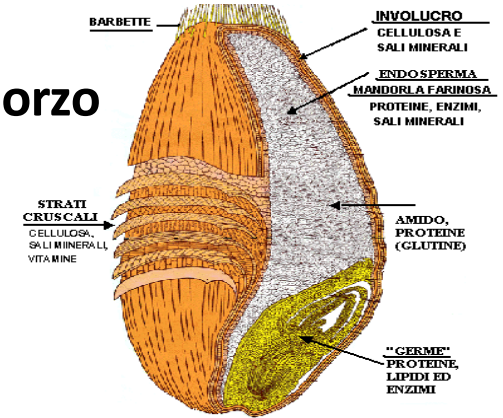
Celiaci in remissione, a dieta senza glutine



Camarca, J Immunol, 2009
Gianfrani, Gastroenterology, 2007
Gianfrani, J Immunol, 2003
Vader, Gastroenterology 2002
Shan, Science 2002

Proteine del Glutine

- ✓ Proteina di riserva (endosperma) del seme di **grano, segale, orzo**
- ✓ Più di cento proteine diverse
- ✓ Si divide in gliadine e glutenine
- ✓ Alto contenuto di glutamina (40%) and prolina (20%): **prolammine**
- ✓ Elevata resistenza alla digestione delle proteasi gastro-intestinali
- ✓ Molteplici sequenze peptidiche attive sui linfociti T di celiaci



Nuove Tecnologie Alimentari del Senza Glutine *dei cereali contenenti glutine*

1. Si può PRETRATTARE LA FARINA e detossificare il glutine prima che venga ingerito?
2. Esistono grani con glutine privo delle sequenze tossiche, e quindi grani tollerati dai celiaci?
3. Si possono ottenere in laboratorio grani non tossici?

Pretrattamento delle farine di frumento con agenti fermentanti

- ✓ Fermentazione prolungata (24 hours at 30°C.) degli impasti di farina con batteri lattici (*L. sanfranciscensis*, *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. hilgardii*) ottenuti da impasti naturali e con proteasi fungine (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*)
- ✓ Totale idrolisi del glutine, dosato con saggio immunoenzimatico R5 (12 mg/kg, ppm) e dei peptidi tossici (analisi proteomiche e spettrometria di massa)
- ✓ Perdita delle proprietà immunostimolanti (test su linfociti T e biopsie di celiaci)
- ✓ Assenza di tossicità in vivo, valutata con challenge orale a breve e a lungo termine

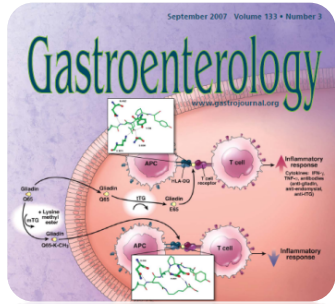
Rizzello et al. *Appl Environ Microbiol.* 2007
Greco et al. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011
Mandile et al. *Alim Phar Ther.* 2017

Aspetti tecnologici delle farine di grano deglutinate attraverso fermentazione prolungata



- ✓ L'idrolisi spinta, con totale distruzione della rete di glutine, riduce le proprietà tecnologiche (viscoelasticità) dell'impasto che vengono sostituite con l'aggiunta di agenti strutturanti, come amido pre-gelatinizzato, o idrocolloidi
- ✓ Le farine ed i prodotti finiti sono sul mercato per i celiaci





Detossificazione delle farine di grano mediante mascheramento del glutine

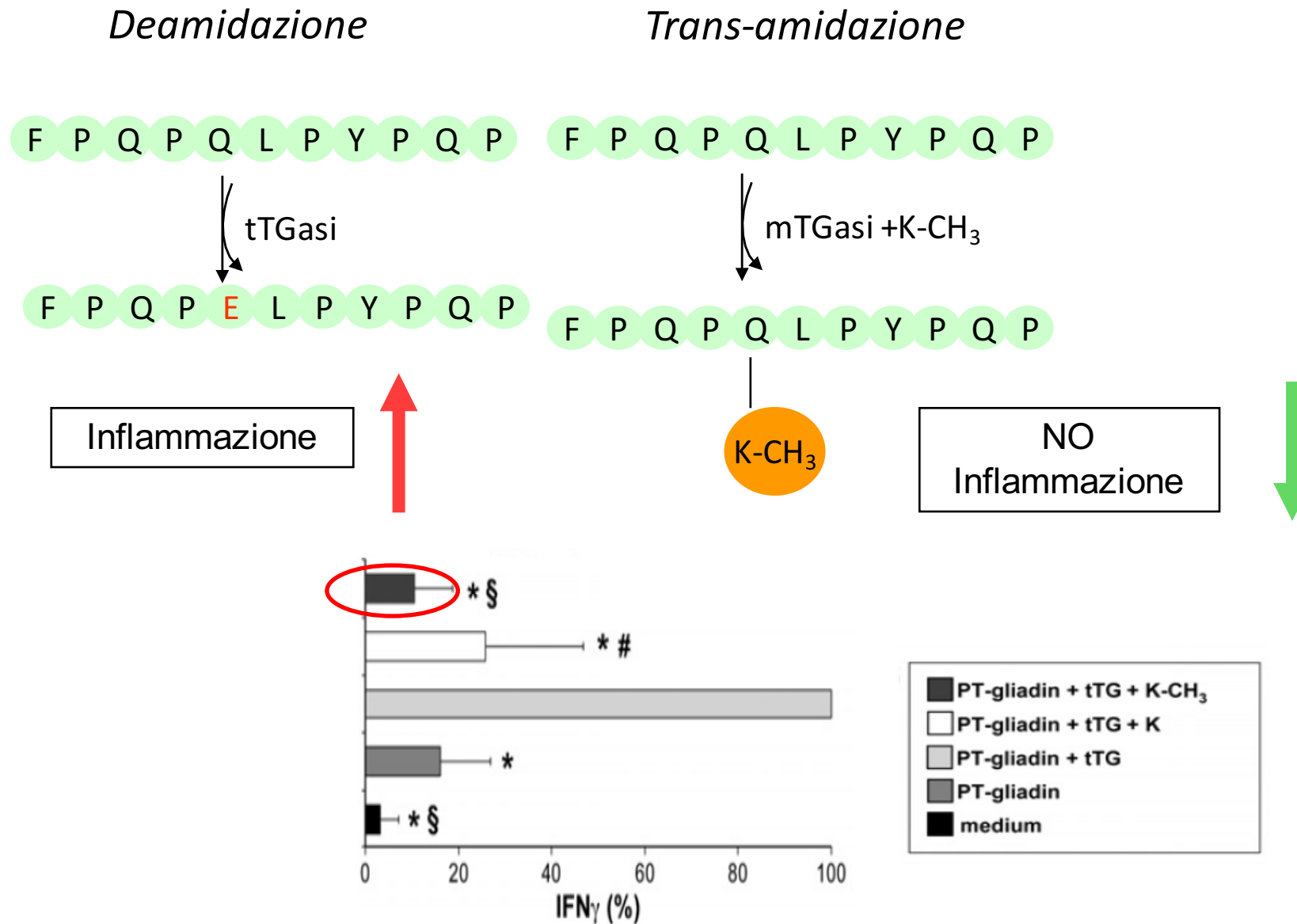
Transamidation of Wheat Flour Inhibits the Response to Gliadin of Intestinal T Cells in Celiac Disease

CARMEN GIANFRANI,* ROSA A. SICILIANO,* ANGELO M. FACCHIANO,* ALESSANDRA CAMARCA,* MARIA F. MAZZEO,* SUSAN COSTANTINI,* VIRGINIA M. SALVATI,[‡] FRANCESCO MAURANO,* GIUSEPPE MAZZARELLA,* GAETANO IAQUINTO,[§] PAOLO BERGAMO,* and MAURO ROSSI*

Trattamento enzimatico delle farine con transglutaminasi microbica e metil lisina (food grade)



Il glutine transamidato (mTGasi + K-CH₃) non attiva le cellule T di celiaci



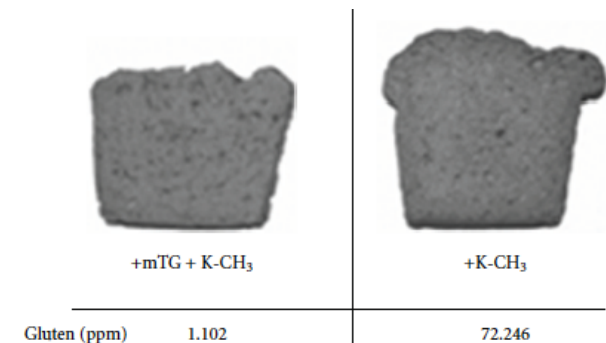
Il trattamento delle farine transamidate è in fase di sperimentazione clinica

Primo studio:

Singolo cieco, 47 celiaci adulti consumano **50 g/die** di pane controllo (N=12) o trattato (N=35). **10/12** dei controlli e **14/35** nei trattati escono dallo studio dopo soli **15 giorni** per la presenza di sintomi o alterazioni permeabilità intestinale.

Normale funzionalità epatica e renale

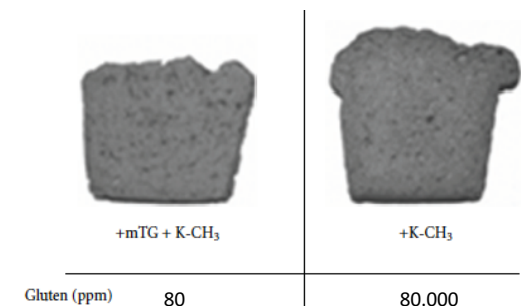
Nei 20 volontari che terminano lo studio (57%), non si osserva danno della mucosa né comparsa di autoanticorpi ([Mazzarella et al., Clin Dev Immunol 2012](#)).



Secondo studio:

Doppio cieco, 21 celiaci adulti consumano **100 g/die** di pane controllo (N=10) o trattato (N=11). Il 70% completa lo studio a 90 giorni in entrambi i gruppi.

14% gruppo trattato e **57%** gruppo controllo sviluppano autoanticorpi ed atrofia dei villi ([Marino et al., Int Immunopharmacol. 2017](#)).

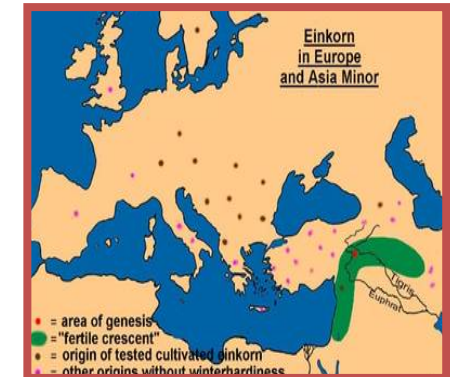


Nuove Tecnologie Alimentari del Senza Glutine

1. Si può PRETRATTARE LA FARINA e detossificare il glutine prima che venga ingerito?
2. Esistono grani con glutine privo delle sequenze tossiche, e quindi grani tollerati dai celiaci?
3. Si possono ottenere in laboratorio grani non tossici?

Il monococco (*Triticum monococcum*) è tra i grani candidati

- Grano diploide AA, noto anche come **piccolo farro** o **Einkorn**
- La sua coltivazione risale a circa 10000 anni fa ed è rimasto inalterato geneticamente
- Ottime proprietà panificatorie e pastificatorie
- La farina integrale è povera di fibre alimentari, ma ricca di proteine, lipidi (in gran parte acidi grassi insaturi), fructani, ferro ed antiossidanti (carotenoidi e polifenoli)
- La presenza del solo genoma AA comporta una ridotta varietà di proteine del glutine (e di potenziali peptidi tossici immunitari), rispetto al grano duro (tetraploide) e tenero (esaploide)
- Presenza di sequenze peptidiche protettive QQPQRPPQQPF
- Diversi centri di coltivazione in Italia



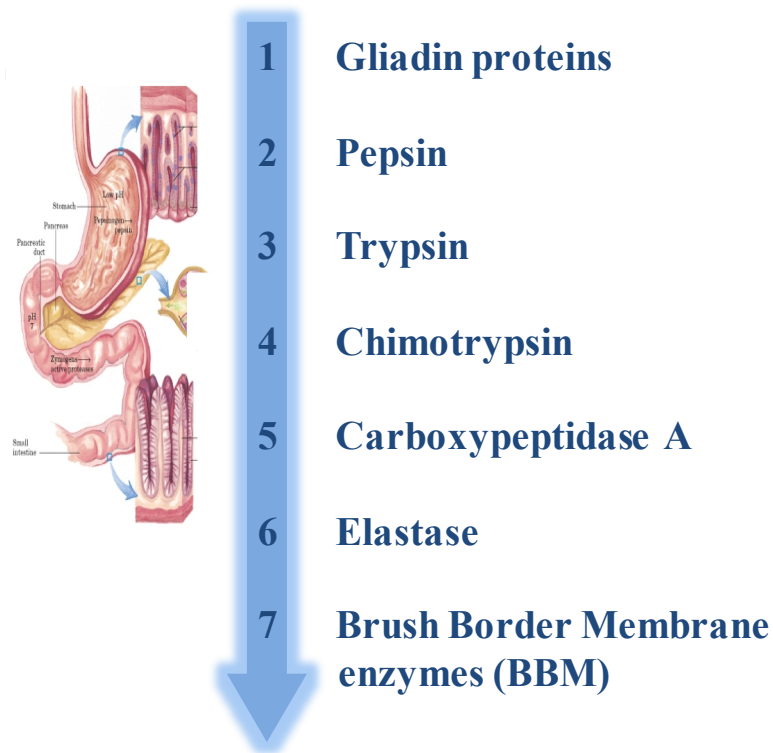
Hidalgo & Brandolini. J Sci Food Agric 2014

Lamacchia et al. Nutrients 2014

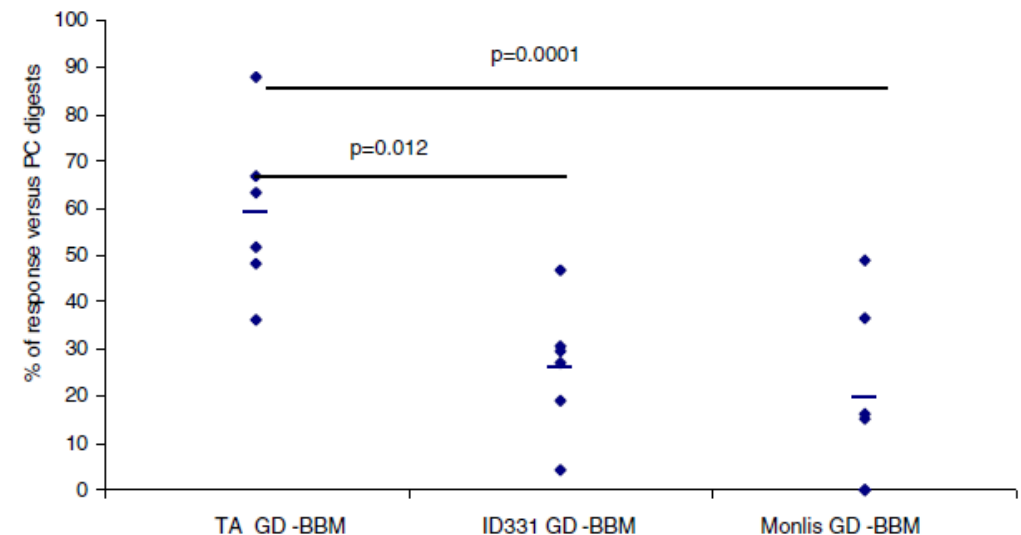
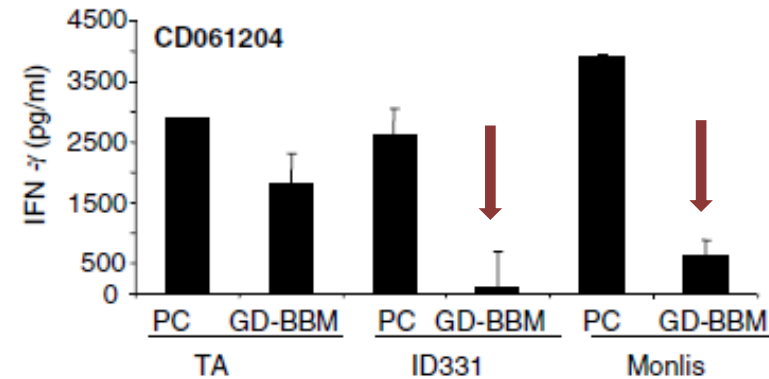
De Vita et al J Cereals Sci 2012

Il grano monococco contiene un glutine più digeribile ed immunologicamente meno attivo

Riproduzione in vitro del processo di digestione gastrointestinale (PTCCE-BBM)



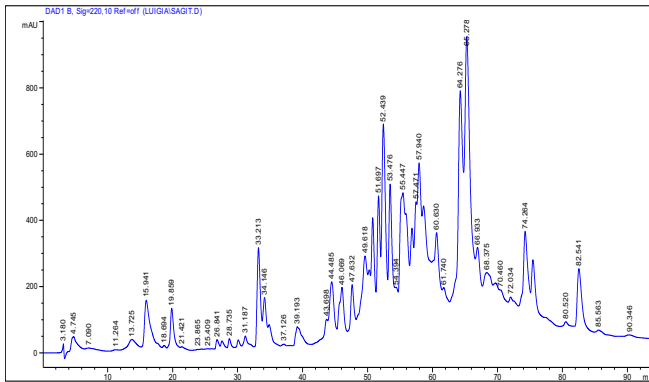
Analisi proteomica e della tossicità immunologica su biopsie intestinali e cellule linfocitarie da soggetti celiaci



Gianfrani et al, Mol Nutr Food Res. 2015

Gianfrani et al, Am J Clin Nut. 2012

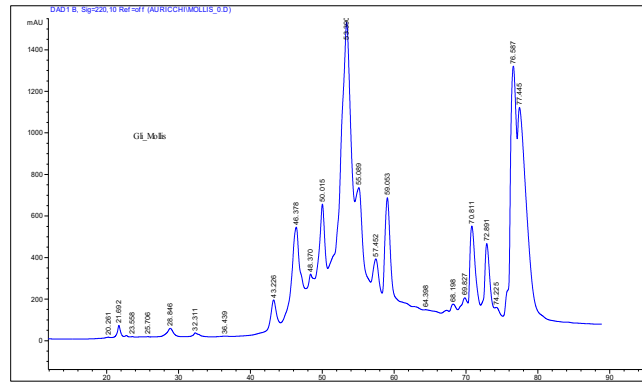
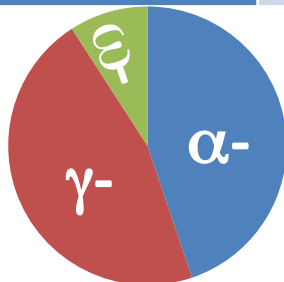
Ridotto rilascio di peptidi dopo idrolisi gastrointestinale



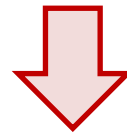
T. aestivum (grano tenero)



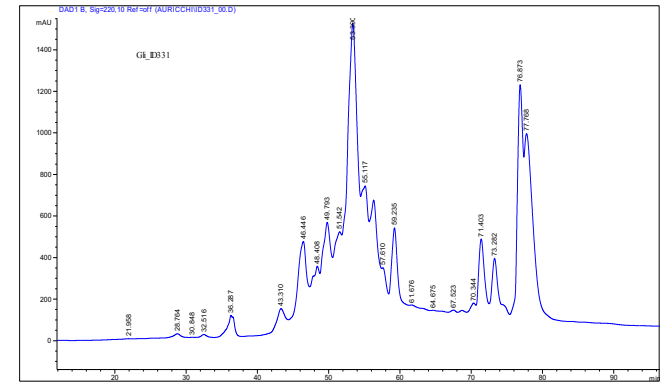
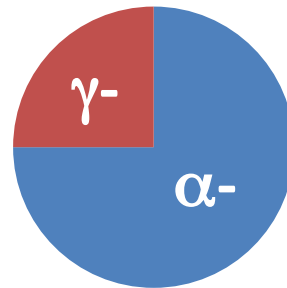
Peptidi	241
α-gliadin	108
ω-gliadin	22
γ-gliadin	111



T. monococcum (Monlis)



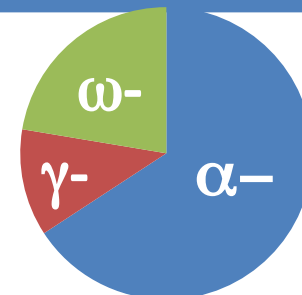
Peptidi	68
α-gliadin	51
γ-gliadin	17



T. monococcum (ID331)

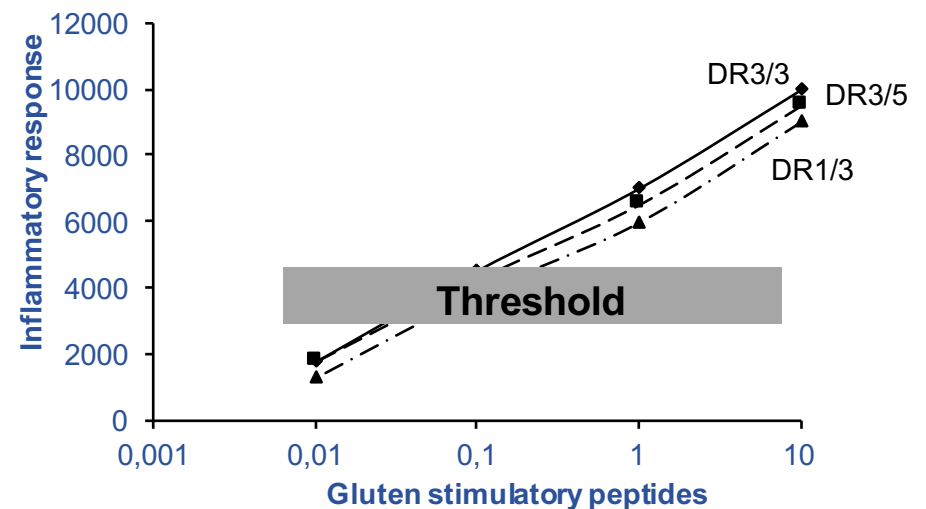


Peptidi	76
α-gliadin	50
ω-gliadin	9
γ-gliadin	17



É possibile prevenire la celiachia nei soggetti a rischio con una alimentazione a base di grani meno tossici?

- ✓ E' nota la quantità minima di glutine per scatenare la patologia, soglia di 20 ppm (20 mg/kg) nelle linee guida
- ✓ Qual è la soglia di glutine per indurre la patologia?
- ✓ Quale è il ruolo dei diversi aplotipi HLA di rischio nella risposta immune avversa?



Catassi, AmJ Clin Nutr 2007
Gibert, AmJ Clin Nutr 2013
Pisapia, J Autoimmun, 2016

Nuove Tecnologie Alimentari del Senza Glutine

1. Si può PRETRATTARE LA FARINA e detossificare il glutine prima che venga ingerito?
2. Esistono grani con glutine privo delle sequenze tossiche, e quindi grani tollerati dai celiaci?
3. Si possono ottenere in laboratorio grani non tossici?

Si possono ottenere in laboratorio grani non tossici?

- Selezione di genotipi di grano tenero e grano duro privi dei loci Gli-A2 e Gli-D2 attraverso l'analisi delle sequenze di glutine in banche dati → ridotto contenuto dei peptidi immunotossici ([van de Broeck et al. Mol BioSyst 2010](#); [Theor Appl Genet 2010](#)).
- Regolazione dell'espressione dei geni delle gliadine con la tecnica del silenziamento genico (con RNAi) → Ridotta attivazione dei linfociti T infiammatori ([Gil-Humanes et al. PNAS 2010](#)).
- Selezione di nuovi cereali mediante ibridizzazione di varietà naturali. Concetto di **Low CD Toxic**: Tritordeum, una nuova specie da incrocio grano duro e orzo con ridotta immunotossicità ([Vaquero et al J Sci Food Agric 2017](#)).
- Silenziamento di geni prolaminici mediante mutagenesi nuove tecnologie di gene editing CRISPR/Cas9 ([Jouanin et al ICDS New Delhi 2017](#)).

Conclusioni

- ✓ La complessità genetica del grano si traduce in una molteplicità di peptidi tossici (repertorio molto ampio)
- ✓ Diverse strategie per rendere deglutinate le farine dei cereali tossici:
1) fermentazione naturale con batteri lattici/funghi, 2) enzimatica per mascherare i peptidi tossici, utilizzando la transglutaminasi e metil lisina
- ✓ Esistono piante ancestrali diploidi (monococco) che hanno meno copie dei geni che codificano per le proteine del glutine
- ✓ Possibilità di incrocio di queste piante per la selezione di grani meno tossici
- ✓ La ridondanza del genoma (poliploidia) rende molto difficile manipolazioni genetiche che silenzino tutti i geni codificanti i peptidi immunotossici