



Valutazione tossicologica, tecnologica e agronomica di cereali per lo sviluppo di genotipi a basso contenuto di fattori tossici connessi alla intolleranza al glutine

Triennio 2002 / 2004



(Attività di ricerca e sperimentazione agraria d'interesse regionale finanziata dalla Regione Marche ai sensi della L.R. 37/99)

PREMESSA

E' sperimentalmente dimostrato che le particolari proprietà tecnologiche del frumento, l'attitudine panificatoria del grano tenero e la qualità pastificatoria del grano duro, sono in larga misura dovute alla presenza di determinate proteine (gliadine e glutenine) contenute nel glutine delle cariossidi di frumento (Payne, 1987; Pogna et al., 1990).

D'altra parte, la tossicità del grano e di altri cereali (orzo, farro, triticale e segale...) per una frazione crescente della popolazione umana affetta da celiachia è dovuta proprio alla particolare natura chimica di queste proteine del glutine. La malattia celiaca è una grave patologia alimentare permanente che provoca un appiattimento dei villi intestinali in individui geneticamente predisposti (in Italia 1 ogni 100-180 abitanti). Il malassorbimento conseguente al danneggiamento dell'epitelio dell'intestino tenue nei celiaci conclamati comporta un ampio spettro di conseguenze quali diarrea, perdita di peso, osteoporosi, anemia, neuropatie, sterilità. Allo stato attuale delle conoscenze la prevenzione dei sintomi patologici è possibile solo

CERMIS Centro Ricerche e Sperimentazione per il Miglioramento Vegetale "N. Strampelli"

Abbadia di Fiastra 3 ~ 62029 Tolentino (MC) Italia • Tel. e Fax +39.0733.203437 • E-mail: cermis@tin.it
Cod. Fisc. e Part. IVA 00810590430 • Registro Regionale Marche delle Persone Giuridiche n. 91 • C.C.I.A.A. Macerata R.E.A. n. 0111780



eliminando completamente dalla dieta e per tutto il resto della vita gli alimenti a base dei cereali sopra citati. ([Premesse progettuali](#))

OBIETTIVI DEL PROGETTO

A) Valutazione delle linee di frumento tenero e duro a bassa tossicità ottenute presso l'Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura (ISC) di Roma; l'analisi si articola in tre settori:

- Tossicologico (al fine di individuare i materiali con minore tossicità);
- Tecnologico (per verificare, nei genotipi a bassa tossicità provenienti dalla fase precedente, le caratteristiche di trasformazione verso prodotti alimentari quali ad esempio pane, pasta, biscotti);
- Agronomico (per i genotipi provenienti dallo screening delle due fasi precedenti, e quindi a ridotta tossicità e con caratteristiche tecnologiche accettabili per la trasformazione).

B) Valutazione di nuovi genotipi di frumento duro a bassa tossicità in fase di selezione.

L'analisi è stata impostata come nel punto precedente.

Per un approfondimento sui genotipi di frumento a bassa tossicità: [Bassa Tossicità](#)

C) Indagini riguardanti il farro comune (*Triticum dicoccum*), per il quale non sono disponibili studi in relazione alla celiachia. Anche per il T. dicoccum è opportuno un approccio multidisciplinare al fine di ottenere informazioni esaurienti, che permettano di verificare se il materiale oggetto di studio può soddisfare le esigenze di bassa tossicità e al tempo stesso i necessari requisiti tecnologici ed agronomici.

D) Sperimentazioni riguardanti il miglio (*Panicum miliaceum*). L'obiettivo dell'attività consiste nel valutare l'ipotesi di introduzione del cereale nell'alimentazione dei celiaci attraverso:

- Recupero di varietà e popolazioni in Italia e all'estero;
- Sperimentazione agronomica del materiale collezionato;
- Indicazione delle norme per una corretta tecnica culturale;
- Valutazione delle caratteristiche qualitative, tecnologiche e salutistiche;



- Possibili usi della granella, tal quale o macinata, nell'alimentazione umana;
- Divulgazione dei risultati e promozione dei prodotti.

A) Valutazione delle linee di frumento tenero e duro a bassa tossicità



Attività realizzata

- Sperimentazione agronomica (moltiplicazione del materiale, prime rilevazioni in campo e sul prodotto raccolto);
- Analisi tossicologiche (test di agglutinazione su cellule K562(S), elettroforesi su gel di poliacrilammide, test di induzione di anticorpi anti-endomisio in espianti di epitelio intestinale coltivati in vitro);
- Analisi tecnologiche.

Conclusioni e sviluppi futuri

Sia dalle prove tecnologiche che da quelle agronomiche risulta che le linee a bassa tossicità (BS) non presentano differenze sostanziali rispetto alle varietà da cui sono state selezionate. Le prove tossicologiche hanno evidenziato una ridotta tossicità delle linee in questione rispetto ai relativi controlli. Questo risultato emerge dai test di agglutinazione su cellule K562 (S), nei quali le linee BS hanno mostrato una Minima Concentrazione Agglutinante (MAC) superiore rispetto ai relativi controlli (CT). Il rapporto medio fra la MAC delle linee BS ed i rispettivi CT è di 3,05, ciò significa che le linee BS risultano essere mediamente 3 volte meno tossiche rispetto ai relativi CT. Il dato viene confermato anche dai test di induzione di anticorpi anti-endomisio in espianti di epitelio intestinale coltivati in vitro nei quali le linee BS hanno dimostrato un livello di induzione lieve e tardivo, a differenza dei CT



nei quali il livello di induzione era medio-alto o addirittura alto. Le caratteristiche di ridotta tossicità sono state poi confermate attraverso la caratterizzazione elettroforetica, infatti si è potuto evidenziare che nelle linee BS mancavano alcune bande proteiche rispetto ai CT.

I dati maggiormente incoraggianti sono però quelli derivati dalle prove in vivo, ovvero quelle prove che prevedono la somministrazione, a soggetti celiaci in stato di remissione, dosi crescenti di glutine nell'arco di nove mesi. I risultati della prova sono stati davvero sorprendenti, dato che la donna sottoposta al test segue oramai una dieta libera, senza nessun sintomo e nessuna alterazione di tipo morfologico e immunologico.

Altri soggetti sottoposti ai test non hanno dato gli stessi incoraggianti risultati, ma questo probabilmente è anche dovuto ad una non completa remissione al momento iniziale della prova.

In base ai risultati raggiunti è possibile affermare che tali linee risultano particolarmente interessanti per tutti coloro che intendono ridurre l'esposizione alle proteine tossiche del glutine, ed in modo particolare ai soggetti celiaci latenti, ovvero a tutti coloro che hanno una elevata probabilità di sviluppare l'intolleranza ma che non presentano nessun sintomo.

Occorrerà sicuramente proseguire i test in vivo e le prove tecnologiche per valutare in modo più approfondito le performance delle farine BS e la miscela di queste con sostanze come il chiosano, capaci di inibire l'effetto tossico di alcune proteine del glutine.

B) Valutazione di nuovi genotipi di frumento duro a bassa tossicità in fase di selezione.

Attività realizzata

- Sperimentazione agronomica (moltiplicazione del materiale, prime rilevazioni in campo e sul prodotto raccolto);
- Analisi d'immagine e separazione delle frazioni proteiche (per selezionare i genotipi migliori).

Conclusioni e sviluppi futuri

Osservando i risultati delle prove eseguite sulle varie generazioni, le linee di frumento duro a bassa tossicità in selezione sembrano di molto interesse anche se sarebbe importante proseguire nel lavoro di selezione per fissare nel migliore dei modi alcuni caratteri e poter iniziare quanto prima le prove tossicologiche e tecnologiche su tali genotipi.



C) Indagini riguardanti il farro comune



Attività realizzata

- Recupero e valutazione agronomica del materiale collezionato;
 - Moltiplicazione del materiale collezionato;
 - Valutazione delle caratteristiche tossicologiche.

Conclusioni e sviluppi futuri

Grazie ad una ricerca sul territorio, con l'aiuto di Istituti Pubblici e di Enti di Ricerca, sono state recuperate e valutate sotto il profilo agronomico, ben 133 accessioni di farro appartenenti alle 3 diverse specie (*Triticum monococcum*, *Triticum dicoccum* e *Triticum spelta*).

La valutazione tossicologica è stata effettuata attraverso una serie di test indiretti (test di agglutinazione su cellule K562 (S) e test in vitro su colture di epitelio intestinale con induzione di anticorpi anti-endomisio e anti-transglutaminasi). È stata inoltre effettuata una caratterizzazione tramite SDS-Page delle diverse accessioni.

Analizzando i dati della caratterizzazione elettroforetica e quelli derivanti dai test di agglutinazione, si è potuto osservare una estrema variabilità fra le accessioni. La MAC è risultata compresa fra un minimo di 100 e un massimo di 512, spettro di valori estremamente ampio che però comprende accessioni, quelle caratterizzate da una MAC elevata, dotate di una tossicità estremamente ridotta.



I primi test condotti in vitro, quelli volti alla ricerca di anticorpi anti-endomisio, hanno dato risultati contrastanti, con valori di tossicità dei CT positivi più bassi di quelli di alcuni CT negativi. Il test è stato quindi ripetuto effettuando però la ricerca di anticorpi trans-glutaminasi. I risultati si sono dimostrati estremamente correlati con quelli dei primi test in vitro ma anche questi non si sono dimostrati attendibili a causa delle stesse motivazioni.

Considerata la grande variabilità della collezione di farro recuperata ed il basso livello di tossicità riscontrato in alcune accessioni in base al test di agglutinazione, sarebbe opportuno, nelle prossime indagini, andare ad effettuare nuovi test indiretti, volti ad una migliore caratterizzazione tossicologica.

D) Sperimentazioni riguardanti il miglio



Attività realizzata

- Recupero di varietà e popolazioni in Italia e all'estero;
- Sperimentazione agronomica sul materiale collezionato;
- Valutazione delle caratteristiche tossicologiche, tecnologiche e nutrizionali.

Conclusioni e sviluppi futuri

L'azione di recupero di varietà e popolazioni locali, è stata effettuata attraverso la collaborazione con aziende ed Istituti italiani, ma soprattutto attraverso la collaborazione con Istituti ed Università straniere (USA, Germania, Russia, Slovenia), ed ha portato al recupero e



valutazione agronomica di una collezione di 27 accessioni appartenenti a tre specie differenti (*Panicum miliaceum* - 23 accessioni, *Setaria Italica* - 3 accessioni e *Pennisetum glaucum* - 1 accessione).

Le prove necessarie alla valutazione della tossicità del miglio nei confronti di soggetti celiaci, sono state eseguite su colture in vitro di cellule CaCo-2. Le prove sono state eseguite allo scopo di verificare l'effetto di inibizione della crescita esercitato da un estratto alcool-solubile di proteine di miglio. I risultati di questa indagine sono stati estremamente positivi in quanto il miglio non ha dimostrato alcuna tossicità nemmeno in concentrazioni piuttosto elevate.

Per completare l'indagine sono stati effettuati dei test per valutare la possibilità di utilizzo della farina di miglio per produrre pasta o pane. Questi test hanno però evidenziato le scarse caratteristiche tecnologiche del miglio. Sia dalle prove di laboratorio che dalle prime prove di trasformazione sono risultati evidenti i problemi relativi alla formazione dell'impasto.

Estremamente interessante sarebbe però proseguire nelle prove tecnologiche, allo scopo di valutare la possibilità di utilizzare il miglio nella produzione di pasta o pane, magari cercando di sfruttare l'effetto glutine esercitato dalla gelatinizzazione dell'amido o eventualmente ipotizzando l'utilizzo della farina di miglio in miscela con altre farine prive di glutine ma in grado di migliorare le caratteristiche tecnologiche.