UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

Corso di Laurea

in

Scienze dell'alimentazione e della nutrizione umana

CONFRONTO TRA VARIETÀ ANTICHE E MODERNE DI FRUMENTI ANCHE IN RELAZIONE A FENOMENI DI INTOLLERANZA ALIMENTARE

Tesi di laurea di

Laura Kerer

Relatore

Prof. Fabio Veronesi

Correlatore

Dott. Renzo Torricelli

Anno Accademico 2016-2017

INDICE

RIASSUNTO 3

ABSTRACT 4

ZITAT 5

1 - LA NASCITA DELL'AGRICOLTURA 6

1.1- La selezione 8

1.2 - La scelta delle specie vegetali da coltivare 9

1.3 – La mezzaluna fertile 11

2 - EVOLUZIONE GENETICA DEL FRUMENTO 13

2.1 – Il genere *Triticum* 14

2.3 - Evoluzione del genere *Triticum* nell'antichità 16

2.4 - Storia e evoluzione del frumento a partire dal '900 19

3 - LA CELIACHIA 22

3.1 - Aspetti epidemiologici – La celiachia in Italia e nel mondo 23

3.2 - La patologia 25

3.3 - Anatomia dell'intestino 26

3.4 - La digestione delle proteine 29

3.5 - Patogenesi 31

3.6 - La componente autoimmune 34

3.7 - Danno alla mucosa intestinale 36

3.8 - Sintomatologia e patolgie associate 38

3.9 - Diagnosi, follow-up e terapia 39

4 - LA SENSIBILITA' AL GLUTINE 42

4.1 - Diffusione 43

4.2 - La diagnosi 44

5 - L'ALLERGIA AL FRUMENTO 45

5.1 - Diffusione 45

5.2 - Manifestazioni cliniche 45

6 - LA QUESTIONE "FRUMENTI ANTICHI E MODERNI". EVIDENZE SCIENTIFICHE RIGUARDO LE DIFFERENZE TRA FRUMENTI ANTICHI E MODERNI 47

6.1 - Gliadine, glutenine e la maglia del glutine 48

6.2 - La quantità totale di proteine 52

6.3 - L'epitopo Glia-α9 53

6.4 - Studi comparativi tra frumenti antichi e moderni 57

6.5 - La riduzione della biodiversità 64

6.6 - Quanto glutine assumiamo con l'alimentazione? 67

6.7 - Confronto tra componenti bioattive nelle specie del genere *Triticum* antiche e moderne 69

7 - CONCLUSIONI 72

BIBLIOGRAFIA 75

SITOGRAFIA 79

RINGRAZIAMENTI 80

RIASSUNTO

L'evoluzione del frumento che oggi viene utilizzato per la produzione di alimenti molto diffusi, come il pane e la pasta, è iniziata all'incirca 12.000 anni fa, quando l'uomo cominciò, in alcune aree del pianeta, a domesticare le specie vegetali che presentavano le caratteristiche a lui più utili. I cereali, fonte di carboidrati, rappresentano nella loro grande varietà la base dell'alimentazione umana nel mondo, basti pensare alle diverse tipologie di frumento diffuse in Europa e negli Stati Uniti, al mais nell'America centrale, al riso in Cina e Giappone e al teff in Africa. Alcune tipologie di cereali, tra i quali il frumento, sono implicate nella patogenesi di patologie, tra le quali la celiachia e la sensibilità al glutine. La diffusione di queste patologie è cresciuta in modo esponenziale a partire dalla seconda metà dello scorso secolo e per tale ragione si sono moltiplicati anche gli studi scientifici che si occupano dell'argomento. Uno degli aspetti presi in esame negli ultimi anni è se ci possa essere una correlazione tra l'evoluzione genetica del frumento e l'incremento di patologie legate al suo consumo. Questi studi nascono anche in risposta alla convinzione, diffusasi in ambito non scientifico, secondo la quale le nuove varietà di frumento sono più ricche di alcune tipologie di componenti rispetto alle vecchie varietà di frumento. Le componenti prese in esame, per quanto riguarda il frumento, sono le gliadine e le glutenine, le proteine che negli impasti danno origine alla maglia tridimensionale del glutine. Numerosi articoli, blog e libri promuovono i frumenti antichi, senza però essere in grado di sostenere la propria posizione con fonti attendibili e ben documentate. Questa tesi, dopo aver ripercorso l'evoluzione genetica del frumento, si sofferma sulle maggiori patologie correlate al suo consumo per poi occuparsi del confronto tra i frumenti antichi (frumenti vestiti quali *Triticum monococcum, T. dicoccum* e *T. spelta*) e le varietà antiche e moderne di frumento (*Triticum aestivum* e *Triticum turgidum* ssp. *durum*) riportando i risultati degli studi scientifici che si sono occupati dell'argomento.

ABSTRACT

The evolution of wheat which nowadays is used for the production of widespread foods, such as bread and pasta, began approximately 12.000 years ago, when humans began, in some areas of the planet, to domesticate those plant species which had the most useful traits to them. Cereals, which are a source of carbohydrates, represent in their great variety the basis of human nutrition in the world, just think of the different types of wheat spread in Europe and the United States, maize in Central America, rice in China and Japan and teff in Africa. Some types of cereals, including wheat, including wheat, are implicated in the pathogenesis of diseases, including celiac disease and gluten sensitivity. The spread of these diseases has grown exponentially from the second half of the last century and for this reason scientific studies dealing with this subject have also multiplied. One of the aspects examined in recent years is whether there could be a correlation between the genetic evolution of wheat and the increase in diseases related to its consumption. These studies are also born in response to the belief, spread in the non-scientific field, according to which the new wheat varieties are richer in some types of components than the old wheat varieties. The examined components, as far as wheat is concerned, are gliadins and glutenins, the proteins which form the three-dimensional gluten net in doughs. Numerous articles, blogs and books promote ancient wheats, without being able to support their position with reliable and well-documented sources. This thesis, after having revisited the genetic evolution of wheat, focuses on the major diseases related to its consumption and then deal with the comparison between the ancient wheats (hulled wheats like *Triticum monococcum, T. dicoccum and T. spelta*) and ancient and modern varieties of wheat (*Triticum aestivum* and *Triticum turgidum ssp. durum*) reporting the results of scientific studies that dealt with the subject.

ZITAT

Die Entwicklung des Weizens, der heute für die Produktion von weit verbreiteten Lebensmitteln wie Brot und Nudeln verwendet wird, begann vor etwa 12.000 Jahren, als der Mensch anfing in einigen Gebieten der Welt die Pflanzenarten zu domestizieren die für ihn die nützlichsten Eigenschaften hatten. Getreidearten sind eine Kohlenhydratquelle und stellen in ihrer großen Vielfalt die Grundlage der menschlichen Ernährung der Welt dar, man braucht nur an die verschiedenen Arten von Weizen zu denken die in Europa und den Vereinigten Staaten verbreitet sind, an den Mais in Mittelamerika, an den Reis in China und Japan und an Teff in Afrika. Einige Arten von Getreide, einschließlich Weizen, sind an der Pathogenese von Krankheiten beteiligt, wie Zöliakie und Gluten-Empfindlichkeit. Die Verbreitung dieser Krankheiten ist seit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts exponentiell gewachsen, aus diesem Grund haben sich auch die wissenschaftlichen Studien die sich mit diesem Thema beschäftigen vermehrt. Eine der Ansichten die in den letzten Jahren untersucht wurden ist ob es einen Zusammenhang zwischen der genetischen Entwicklung des Weizens gibt und der Zunahme von Krankheiten die mit ihrem Verzehr verbunden sind. Diese Studien sind auch als Antwort auf die im nichtwissenschaftlichen Bereich verbreitete Überzeugung entstanden, dass die neuen Weizensorten im Vergleich zu den alten einen höheren Anteil einiger Komponenten haben. Bei Weizen handelt bei diesen um Gliadin und Glutenin, die Proteine, die im Teig das dreidimensionale Netz des Glutens bilden. Zahlreiche Artikel, Blogs und Bücher fördern alte Weizensorten, ohne ihre Überzeugung mit zuverlässigen und gut dokumentierten Quellen stützen zu können. Diese Magisterarbeit berichtet zuerst über die genetische Evolution des Weizens, konzentriert sich danach auf die wichtigsten Krankheiten die mit ihrem Verbrauch verbunden sind und befasst sich dann mit dem Vergleich zwischen alten Weizen (Schließfruchtweizen wie *T. monococcum*, *T. dicoccum* und *spelta*) und alte und moderner Weizensorten (*Triticum aestivum* und *Triticum turgidum ssp. durum*), und erläutert die Ergebnisse von wissenschaftlichen Studien die sich mit dem Thema befasst haben.

1 - LA NASCITA DELL'AGRICOLTURA

L'agricoltura nacque all'incirca 12.000 anni fa, a partire da alcune aree circoscritte, quali la mezzaluna fertile, l'America centrale, la Cina, le Ande e gli Stati Uniti orientali, per poi diffondersi progressivamente nel resto del mondo. Molte informazioni riguardo agli albori di agricoltura e allevamento sono contenute nell'ottimo libro di Jared Diamond, "*Guns, Germs and Steel. The Fates of Human Societies.*" (1997). Fino all' 8.000 a.C. gli uomini erano stati esclusivamente cacciatori-raccoglitori, e tali continuarono ad essere, almeno in parte, anche dopo aver conosciuto l'allevamento degli animali e la coltivazione delle piante. Queste tecniche sviluppate come sopra detto in alcune regioni del nostro pianeta, furono esportate in zone nuove tramite due modi: attraverso l'invasione di territori da parte di popolazioni che erano già a conoscenza di tecniche di allevamento di piante e bestiame, oppure tramite la diffusione di queste informazioni tra gruppi di popolazioni diversi e vicini geograficamente.

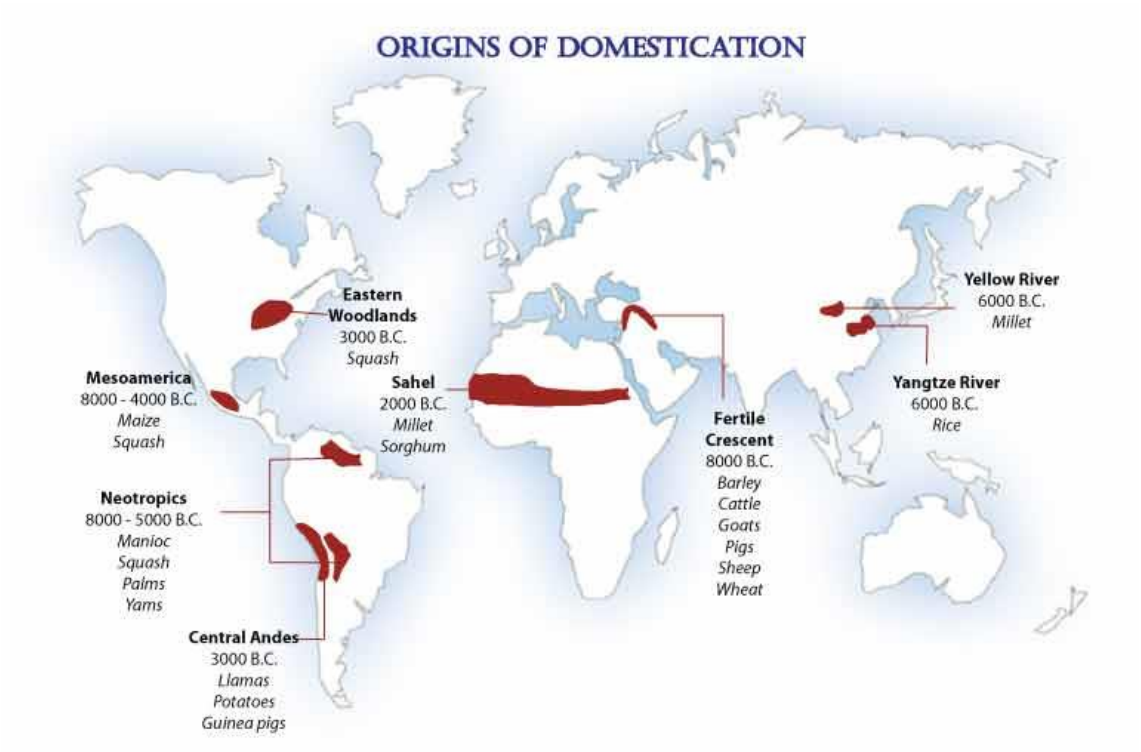

Figura 1 Centri di origine della domesticazione
(http://www.uky.edu/Ag/AnimalSciences/instruction/asc684/CMaps/ASC684%20Coevolution.html)

Il metodo principale che viene utilizzato per datare reperti archeologici di natura organica è quello della misurazione degli isotopi del ^{14}C e ^{12}C e del loro rapporto. Ovviamente il metodo non è privo di errori, ad esempio il materiale raccolto può aver subito contaminazioni da parte di altro materiale organico che si trova nello stesso luogo; inoltre il rapporto tra i due isotopi non è rimasto costante nel lungo periodo storico ma ha subito delle variazioni. Questa metodologia tuttavia resta, con le dovute accortezze, la tecnica migliore e più precisa.

Diamond (1997) indica che è stato possibile individuare 5 aree geografiche sul nostro pianeta in cui si crede che l'agricoltura si sia evoluta in modo indipendente. Queste aree sono la mezzaluna fertile nel Vicino Oriente, la Cina, il Messico centrale e meridionale, le Ande e gli Stati Uniti orientali (Figura 1). Si ritiene che i primi agricoltori fecero la loro comparsa in una di queste zone prima che in tutte le altre, ovvero nella mezzaluna fertile per i motivi che verranno esposti al termine di questo capitolo. Esistono poi altre 4 aree in cui non c'è la certezza che l'agricoltura sia nata in modo spontaneo o sia arrivata attraverso lo spostamento di popolazioni. Queste aree sono la Nuova Guinea, il Sahel, l'Etiopia e l'Africa equatoriale.

Il fatto che in tutte queste aree l'uomo cominciò, tramite l'osservazione dell'ambiente circostante, ad imparare come diventare un agricoltore e un allevatore dipende da una serie di fattori. Sicuramente influirono le condizioni climatiche, che favorirono la proliferazione spontanea di alcune specie che risultarono poi gradite e utili all'uomo. Tra queste, per esempio, possiamo ricordare i cereali selvatici che abbondavano nel Medio Oriente alla fine del Pleistocene. Influì anche la riduzione della disponibilità di specie che avevano permesso all'uomo di vivere di caccia e raccolta, in altre parole ci fu una riduzione di risorse naturali. Il terzo fattore fu una sempre migliore conoscenza a livello di produzione di strumenti utili per raccolta e lavorazione, oggetti quali per esempio il mortaio, le falci e anche contenitori di grandi dimensione che venivano intonacati ed usati come silos sotterranei per lo stoccaggio delle scorte alimentari.

Tutte le tecniche colturali e di allevamento vennero apprese e migliorate lentamente, proprio perché coltivare ed allevare erano attività che l'essere umano non aveva mai fatto (Diamond, 1997). Il tutto, con grande probabilità, nacque dall'osservazione di fenomeni casuali, come la nascita spontanea di piante da cumuli di letame o dai mucchi di rifiuti domestici. I primi agricoltori, o aspiranti tali, dovettero procedere a tentativi.

Si trattò di un processo evolutivo caratterizzato da crescita ed espansione graduale. (Diamond, 1997)

La nascita e la diffusione dell'agricoltura gettò le basi della società strutturata come la conosciamo noi. Il fatto di poter coltivare ed allevare legava l'uomo al territorio, gli permise di avere più figli e fare scorte di cibo, due cose impensabili per gruppi di popolazioni che erano costretti a spostarsi continuamente. Nacquero quindi villaggi sempre più popolati grazie alla maggiore disponibilità di cibo. Piano piano si vennero a formare dei gruppi all'interno della popolazione i quali potevano occuparsi di altro dato che non c'era più il costante bisogno di andare alla ricerca di cibo per sopravvivere. Tra questi possiamo ricordare per esempio i guerrieri e i sacerdoti, oppure coloro che si occupavano della produzione di ciò che serviva per coltivare, lavorare, conservare il cibo. Ovviamente tutta questa evoluzione fu lenta e per lungo tempo, nonostante il bagaglio di conoscenze riguardo ad allevamento e coltivazione si fosse ampliato, le popolazioni non diventarono completamente sedentarie.

1.1- LA SELEZIONE

Diventando agricoltore l'uomo iniziò ad attuare veri e propri processi selettivi, scegliendo le piante che avevano le caratteristiche più utili. Spesso queste caratteristiche rappresentavano delle eccezioni, determinate da mutazioni casuali. Vennero scelte infatti le piante con i frutti più grandi e carnosi, con le fibre più lunghe, o che avevano pochi semi e quelle i cui frutti e i semi non risultavano nocivi.

Sono svariati gli esempi di specie vegetali che in origine erano diverse da quelle che l'uomo cominciò a selezionare e coltivare. Basti pensare al mais per esempio, la cui spiga (pannocchia) oggi raggiunge i 45 cm di lunghezza, e che inizialmente raggiungeva a malapena pochi centimetri (Figura 2).

Figura 2: Evoluzione della spiga di Zea mays L.
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cb/Maize-teosinte.jpg)

I cereali a paglia presenti nelle aree di prima domesticazione (dei cosiddetti cereali "a paglia" fanno parte ad esempio i frumenti, il farro e l'orzo) in origine disseminavano i propri semi in quanto, raggiunta la maturazione, la spiga faceva cadere le cariossidi (i così detti semi). Ovviamente all'uomo servivano piante prive di questa caratteristica (indicata con il termine inglese *shattering*) in quanto per garantire una adeguata raccolta i semi non dovevano cadere ma restare attaccati allo stelo, permettendone così la raccolta mediante l'uso di falcetti. Le dimensioni dei semi di questi cereali inizialmente era assai ridotta. Questi semi dovevano proliferare su un terreno asciutto e arido, e c'era poca competizione tra le piante. L'uomo cominciò a migliorare le caratteriste del terreno, arandolo e concimandolo. La semina effettuata dagli agricoltori inoltre era più fitta di quella che i cereali facevano spontaneamente, c'era quindi una maggiore competizione tra le singole piante. I semi che meglio si adattavano a queste condizioni non erano più quelli piccoli, ma quelli di dimensioni maggiori.

1.2 - LA SCELTA DELLE SPECIE VEGETALI DA COLTIVARE

La principale fonte di calorie dell'alimentazione umana sono i carboidrati. Questa è una costante che possiamo trovare in ogni continente del nostro pianeta. I carboidrati vengono forniti principalmente dai cereali, o dagli pseudocereali. Parliamo quindi di frumento, orzo, segale, riso, mais, avena, farro ma anche di quinoa e grano saraceno. Sono fonte di alimentazione umana anche i tuberi e le radici, ovvero la patata (*Solanum tuberosum* L.), la

manioca (*Manihot esculenta* Crantz), il taro (*Colocasia esculenta* L.) e l'igname (*Dioscorea* L.).

Accanto ai carboidrati, sin dagli albori dell'agricoltura, in tutte le zone in cui questa veniva praticata, vennero coltivate anche le Leguminosae, fonte di proteine vegetali. Principalmente vennero coltivate lenticchie (*Lens culinaris* Medik.) e piselli (*Pisum sativum* L.), ma anche ceci (*Cicer arietinum* L.) e fagioli (*Phaseolus vulgaris* L.) di varie tipologie.

Dalla combinazione di cereali e legumi risultava un discreto equilibrio, essendo il pasto in grado di fornire carboidrati e proteine. Questo binomio è una costante di tutte le regioni in cui l'agricoltura cominciò ad essere praticata:

- Mesopotamia (Medio Oriente) – frumento, orzo, lenticchie, piselli
- America centrale – mais, fagioli
- Cina – riso, miglio, soia
- Ande – quinoa, fagioli
- Africa – riso, miglio africano, fagioli, arachidi

Oltre alle specie che potevano fornire carboidrati e proteine erano importanti anche quelle che producevano fibre tessili, come per esempio il lino.

Nel capitolo VIII di "Guns, Germs and Steel" (Diamond, 1997) viene illustrato come mai, tra le tante specie vegetali esistenti, ne fu scelta solo una percentuale ridottissima per la coltivazione.

Le specie vegetali esistenti sul nostro pianeta sono all'incirca 200.000. Sono davvero molte, rispetto per esempio ai mammiferi di grossa taglia, le cui specie al mondo sono all'incirca 150. Delle 200.000 specie vegetali molte possono essere escluse non risultando commestibili, delle restanti qualche centinaio fu in qualche modo domesticato. Si può notare, osservando attentamente quali sono le specie vegetali impiegate in agricoltura, che le più utilizzate sono soltanto 12. A queste 12 appartengono 5 cereali, ovvero il riso, il mais, il frumento, l'orzo e il sorgo. Ci sono poi un albero da frutto (il banano), un legume (la soia) e 2 tuberi (la patata e la manioca).

Le specie vegetali scelte avevano in larga parte una serie di caratteristiche che le rendevano particolarmente adatte alla domesticazione, ovvero il processo tramite il quale le piante o gli animali selvatici vengono adattati all'uomo e all'ambiente antropizzato.

Prima di tutto si trattava generalmente di piante aventi un ciclo annuo. Non era quindi necessario attendere che la pianta si sviluppasse per diversi anni prima che potesse entrare in produzione. Le specie che avevano le caratteristiche adatte per la domesticazione dovevano anche essere già presenti nel territorio, che doveva ovviamente favorire una loro abbondante proliferazione. Pensando alla mezzaluna fertile, per esempio, i cereali erano molto diffusi.

Giocò un ruolo importante anche la tipologia di riproduzione delle specie. Le piante autogame risultarono le più adatte dato che erano in grado di riprodursi in modo autonomo. In alcune occasioni piante prevalentemente autogame si incrociarono con altri individui della stessa specie o di altre specie con esse sessualmente compatibili. Nacquero così degli ibridi, come nel caso del frumento tenero.

Le specie migliori per la domesticazione dovevano inoltre avere semi di grandi dimensioni, adatti ad essere raccolti e lavorati con facilità.

1.3 - LA MEZZALUNA FERTILE

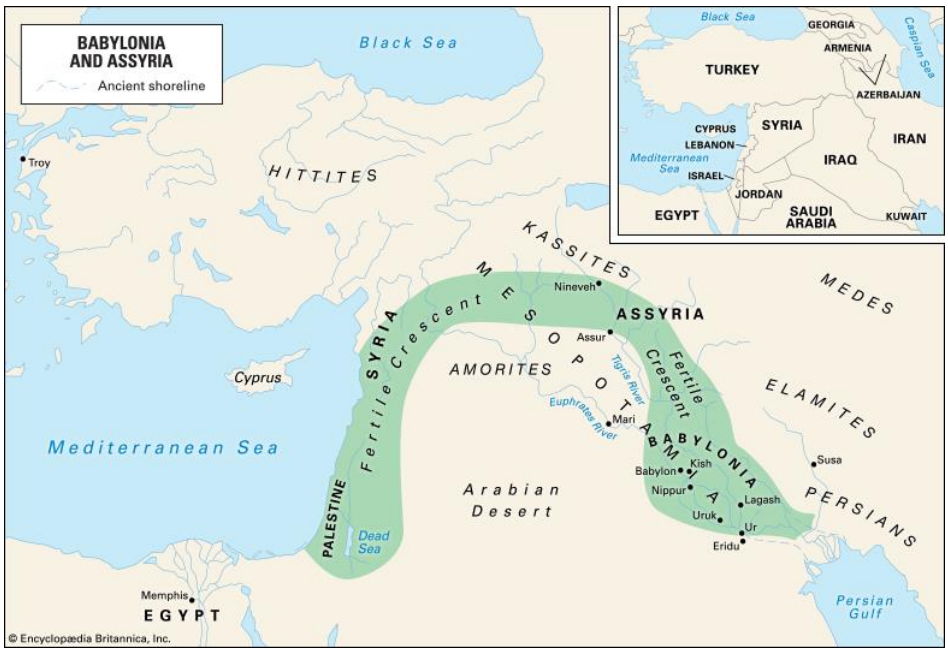

Figura 3 La mezzaluna fertile

(Encyclopedia Britannica, https://www.britannica.com/place/Fertile-Crescent)

Con il termine di mezzaluna fertile (*fertile crescent*) secondo l'American Heritage® Dictionary of the English Language, Fifth Edition. Copyright © 2016 by Houghton Harcourt Publishing Company si intende "*A region of the Middle East extending from the Levant across the northern part of the Syrian Desert to the Tigris and Euphrates Rivers. Climatic and ecological conditions in the Fertile Crescent favored the Neolithic development of agriculture, eventually giving rise to such civilizations as Sumers, Egypt, Babylonia and Phoenicia*".

La regione della mezzaluna fertile (Figura 3) fu la prima in cui, in base alle conoscenze attuali, l'uomo cominciò a praticare l'agricoltura. Questo poté accadere perché in questa regione si presentarono una serie di fattori concomitanti. Prima di tutto tra le specie vegetali presenti alcune avevano le caratteristiche elencate nel paragrafo precedente, ovvero:

- Erano prevalentemente autogame
- Erano a ciclo annuo
- Avevano semi utilizzabili con facilità

In aggiunta a quanto sopra indicato si tratta di una regione avente le condizioni climatiche adatte per la proliferazione delle piante con le caratteristiche adatte ad essere utilizzate dall'uomo. Il territorio presenta, inoltre, aree aventi altitudini diverse. Questo fattore venne sfruttato dai primi agricoltori dato che permise loro di coltivare in momenti diversi, ad altitudini diverse, la stessa coltura.

Altri fattori che hanno spinto gli uomini della mezzaluna fertile verso l'agricoltura e l'allevamento sono da ricercare nel calo della numerosità degli animali da cacciare e la presenza di specie animali addomesticabili (ovini, bovini, suini, caprini).

In questa regione diventare agricoltori era molto più vantaggioso che restare cacciatori-raccoglitori. Ed è questo il punto cruciale che della mezzaluna fertile l'area del pianeta nella quale la prima volta si sviluppò l'agricoltura.

2 - EVOLUZIONE GENETICA DEL FRUMENTO

Il frumento è un cereale appartenente alla famiglia delle Poacee (*Poaceae*). In realtà questa famiglia è stata riclassificata abbastanza recentemente come tale, prima ci si riferiva ad essa con il nome Graminacee (*Gramineae*).

Figura 4 Triticum aestivum

(https://www.britannica.com/plant/wheat)

Le Poacee comprendono non soltanto specie vegetali destinate all'alimentazione umana, come il frumento tenero e il frumento duro, ma anche altre numerose specie di piante annuali e perenni, sia spontanee che coltivate, destinate anche all'alimentazione animale e ad altri utilizzi, quali ad esempio la produzione di tappeti erbosi a uso sportivo, tecnico e ricreativo.

È proprio con i cereali che l'uomo cominciò il proprio percorso da agricoltore all'incirca 12.000 anni fa.

Il frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) (Figura 4) è uno dei cereali più coltivati e consumati al mondo. All'incirca il 75% della popolazione mondiale consuma frumento. Viene coltivato dal Circolo Polare Artico fino alle regioni meridionali dell'Argentina, sia al livello del mare che a 3.000 metri di altitudine (Bressanini e Mautino, 2015).

Oltre al frumento tenero ci sono altri cereali tra le colture più diffuse a livello mondiale:

- Frumenti vestiti come farro monococco (*T. monococcum, AA, 2n = 2x =14),* spelta (*T. spelta*, AABBDD, 2n = 6x = 42*),* farro dicocco *(T. dicoccum,* AABB, 2n = 2x = 28*)* (il cui rachide si disarticola con facilità, dopo la trebbiatura la granella deve essere sottoposto a un'ulteriore operazione, la pilatura, per separare le cariossidi dalla pula)
- Frumenti nudi come il frumento duro (*T. turgidum* subsp. *durum,* AABB, 2n = 4x = 28*)* (categoria di cui fa parte anche il frumento tenero (*T. aestivum,* AABBDD, 2n = 6x = 42*);* il rachide non si disarticola con facilità, le cariossidi non devono essere sottoposte a ulteriori operazioni per essere separate dalla pula)
- Orzo (*Hordeum vulgare* L., 2n = 2x = 14)
- Segale (*Secale cereale* L., RR, 2n= 2x = 14)
- Avena (*Avena sativa* L., AACCDD, 2n = 6x = 42)
- Riso (*Oryza sativa* L., 2n= 2x = 24)
- Miglio (*Panicum miliaceum* L., 2n = 4x = 36)
- Panico (*Panicum italicum* L., 2n = 2x = 18)
- Sorgo (*Sorghum vulgare* L., 2n= 2x = 20)
- Mais (*Zea mays* L., 2n= 2x = 20)

2.1 - IL GENERE TRITICUM

Prima di trattare l'evoluzione del genere *Triticum* è importante fare una premessa che riguarda il numero cromosomico delle piante appartenenti a questo genere.

È possibile distinguere frumenti diploidi, tetraploidi ed esaploidi. Nel genere *Triticum* il numero cromosomico di base, che viene indicato con la lettera "x", è pari a 7. Ciò che distingue le varie tipologie di frumento è il numero complessivo di cromosomi (il livello di ploidia), il quale può essere ripetuto 2, 4 o sei volte.

Avremo quindi:

- Frumenti diploidi, 2x (2 * 7 = 14 cromosomi)
- Frumenti tetraploidi, 4x (4 * 7 = 28 cromosomi)
- Frumenti esaplodi, 6x (6 * 7 = 42 cromosomi)

(Figura 5)

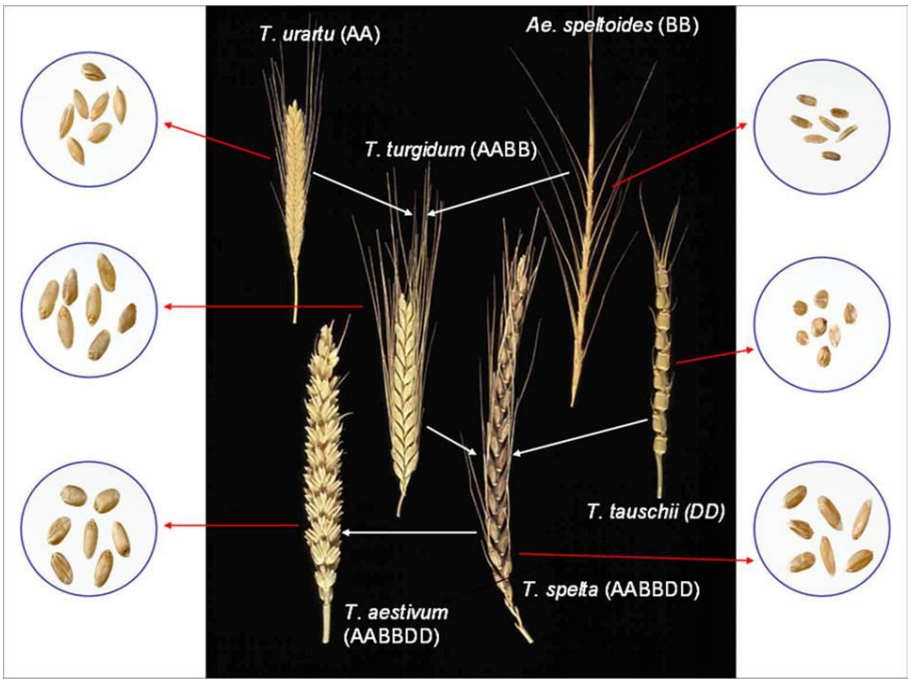

Figura 5 Frumenti diploidi, tetraploidi ed esaploidi

(http://horty.altervista.org/blog/2014/12/27/e-agricoltura-fu-parte-prima/)

In tabella 1 sono riportati alcuni esempi di frumenti, divisi in base alla ploidia.

Tabella 1. Esempi di frumenti divisi in base alla ploidia

Ploidia	**Specie**	**Nome comune**
DIPLOIDE	*T.* ssp. *monococcum*	Monococco (farro piccolo)
TETRAPLOIDE	*T. turgidum* ssp. *durum*	Frumento duro
	T. turgidum ssp. *turgidum*	Grano del miracolo
	T. turgidum ssp. *turanicum*	Grano turanico (Khorasan)
	T. turgidum ssp. *polonicum*	Grano polonico
	T. turgidum ssp. *dicoccum*	Farro dicocco
ESAPLOIDE	*T. aestivum* ssp. vulgare	Frumento tenero
	T. aestivum ssp. *spelta*	Farro spelta (farro grande)

Nel frumento, come anche in altre piante superiori, si ha una condizione di allopoliploidia, ovvero sono presenti più corredi cromosomici completi provenienti da specie diverse.

Questa condizione è frutto di una ibridazione interspecifica, la quale dovrebbe dare origine a degli individui sterili, e della successiva poliploidizzazione. La sterilità è data dal fatto che le serie cromosomiche che si trovano nello zigote dell'ibrido non sono omologhe. Può però accadere che ci sia un raddoppiamento del numero cromosomico. In questo modo ogni cromosoma avrà un suo omologo e l'appaiamento meiotico potrà avvenire regolarmente e l'ibrido risulterà in tal modo fertile.

2.3 - EVOLUZIONE DEL GENERE *TRITICUM* NELL'ANTICHITÀ

L'evoluzione del genere *Triticum* (Figura 6) così come lo conosciamo oggi inizia 12.000 anni fa in Medio Oriente. Saranno poi i primi agricoltori a portare con loro i cereali e a diffonderli in Europa e nell'Africa settentrionale e poi nel resto del pianeta.

Nel libro "Contro Natura" il chimico e divulgatore scientifico Dario Bressanini e Beatrice Mautino danno una chiara descrizione della storia di questa evoluzione.

Circa 20 milioni di anni fa la famiglia delle Poacee si scisse, dando origine agli antenati di mais, sorgo, orzo e avena. L'ultima importante suddivisione fu quella che vide la divisione tra *Triticum* e *Aegilops* (Bressanini e Mautino, 2015).

Facendo poi un salto avanti nel tempo e arrivando a 12.000 anni fa si avrà la graduale transizione dalle forme selvatiche alle forme domesticate. La selezione attuata dai primi agricoltori riguardò soprattutto tre caratteri:

- Dimensione della cariosside
- Facilità con la quale il rivestimento, ovvero le glumelle, potevano essere rimosse dalla cariosside
- Fragilità della spiga

(Porfiri, 2014)

Il primo ad essere domesticato dall'uomo fu il *Triticum boeticum*. Da lui origina il farro monococco, ovvero il *Triticum monococcum*, che ancora oggi viene coltivato. Si tratta di una specie diploide, avente genoma A.

Un altro protagonista della storia dell'evoluzione del genere *Triticum* è *Triticum urartu* il quale, all'incirca 300.000 anni fa, si incrociò con una pianta del genere *Aegilops*, ovvero

Aegilops speltoides. Questa unione, in cui *A. speltoides* donò tutto il suo genoma a *T. urartu*, diede origine al farro selvatico, ovvero *T. dicoccoides*, il cui genoma è AABB, grazie al raddoppiamento cromosomico. Dato che *A. speltoides* donò il suo intero genoma a *T. urartu*, entrambi diploidi, il frutto di questa unione fu una specie tetraploide, avente il numero doppio di cromosomi rispetto ai genitori. In altre parole, nel farro selvatico sono presenti 4 copie di ciascun cromosoma.

Anche il farro selvatico venne domesticato e il frutto di questa domesticazione fu il farro dicocco, ovvero il *T. dicoccum* (AABB). Questo farro diede origine, tramite mutazioni genetiche spontanee e processi di domesticazione ad altre specie tetraploidi del genere *Triticum*, tra cui: *T. polonicum, T. turanicum, T. carthlicum, T. durum*. Tutte queste specie condividono il genoma AABB.

Circa 9.000 anni fa si vengono a formare poi le specie esaploidi, *T. spelta* e *T. aestivum*. Queste specie sono frutto dell'incrocio tra *T. dicoccum* e una specie diversa del genere *Aegilops*, ovvero *A. tauschii*, il cui genoma è DD. Quest'ultimo ha donato interamente il suo genoma a *T. dicoccum*. Come già avvenuto in passato qui si prodotta una modificazione del numero cromosomico. Le specie esaploidi così formatesi presenteranno numero cromosomico somatico esaploide.

Il primo esaploide a formarsi risulta essere stato, avente come genoma AABBDD. Dal *T. spelta* si è originato, all'incirca 8.500 anni fa, il ben noto *T. aestivum* (anch'esso ovviamente AABBDD), ovvero il frumento tenero.

(Bressanini e Mautino, 2015)

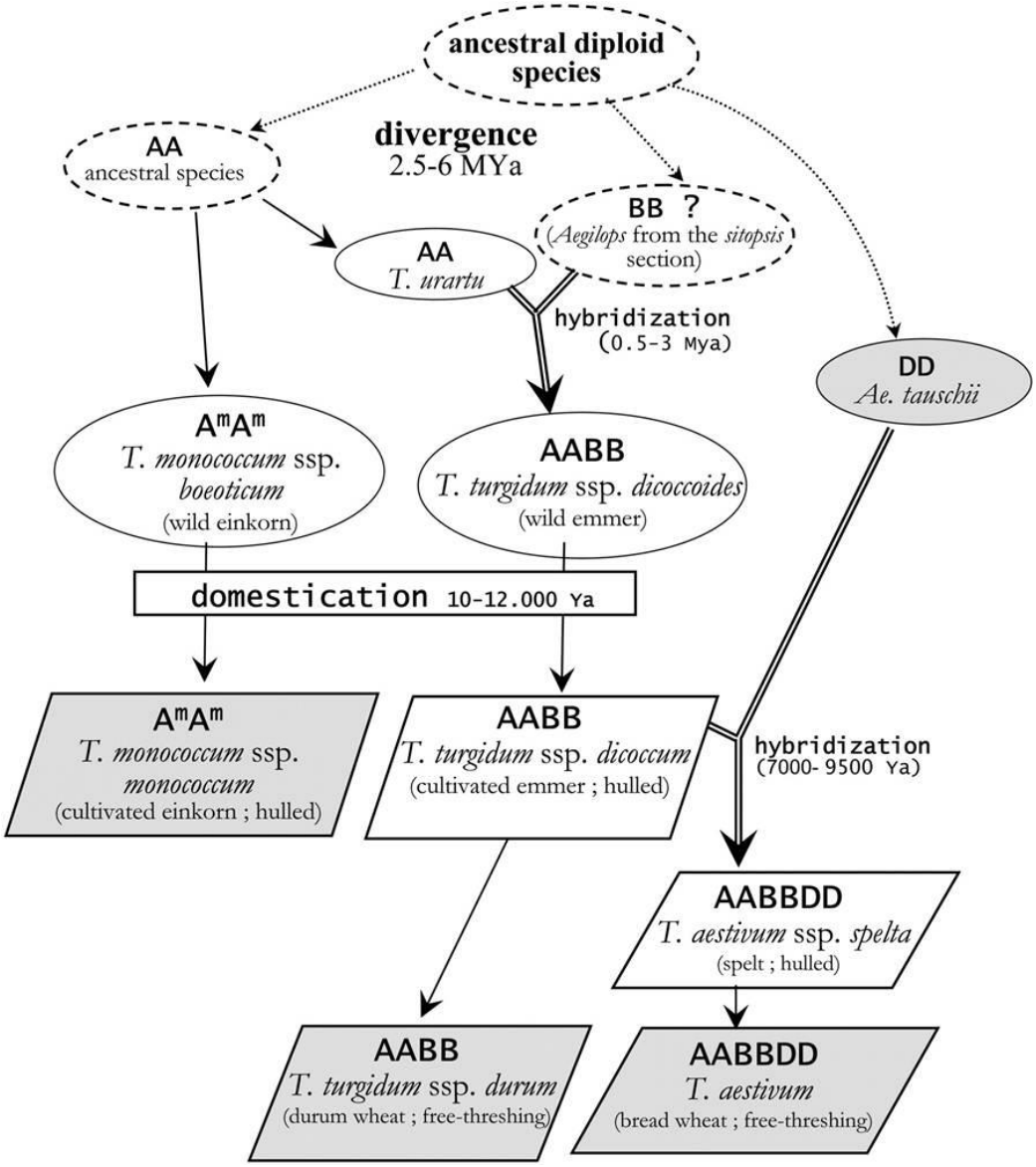

Figura 6 Evoluzione del genere Triticum

(http://bressanini-lescienze.blogautore.espresso.repubblica.it/2016/03/24/quel-mostro-genetico-chiamato-frumento/)

2.4 - STORIA E EVOLUZIONE DEL FRUMENTO A PARTIRE DAL ‘900

Parlando di frumento e del suo miglioramento genetico avvenuto a partire dall’inizio del XX secolo non si può non parlare di Nazareno Strampelli. Un ritratto molto accurato di Strampelli viene fatto da Sergio Salvi nel libro “L’uomo che voleva nutrire il mondo” (2016).

Strampelli nasce nel 1866 nelle Marche e crescendo è testimone dell’Italia agricola e povera, come lui stesso ricorda nel 1905. Dopo aver compiuto gli studi liceali decide di iscriversi all’università, completando il suo percorso universitario con la laurea in agraria a Pisa, nel 1891. Strampelli diventa poi assistente del professore Attilio Fabrini, docente titolare della cattedra di chimica, fino al 1901.

Un evento fondamentale di quegli anni è la riscoperta del lavoro di Mendel, ovvero *le leggi dell’ereditarietà dei caratteri genetici*, che avvenne nel 1900. Con le leggi di Mendel viene preso in considerazione, per il miglioramento genetico, la tecnica dell’incrocio. Fino a quel momento l’incrocio non era stato considerato un metodo efficace né per introdurre nuovi caratteri utili nella popolazione, né per mantenere i caratteri desiderati anche dopo diverse generazioni.

Attraverso gli studi di Mendel e dei suoi principi inizia a comprendere i meccanismi di base della trasmissione ereditaria e utilizzerà queste conoscenze per effettuare una selezione mirata di determinati caratteri che dovevano rimanere presenti anche nelle generazioni future.

Nel 1900 Strampelli effettua il suo primo incrocio tra varietà di frumento: il Noé, resistente all’ allettamento ma soggetto all’attacco della ruggine del frumento e il Rieti, resistente alle ruggini ma soggetto all’allettamento. Di questo primo esperimento non si sa molto, a parte il fatto che non ebbe successo. Non risulta una vera e propria documentazione relativa alla procedura adottata da Strampelli. In realtà anche il luogo dove venne effettuato l’esperimento resta ancora oggi non identificato.

Nel 1900 Strampelli si sposa con Carlotta Parisani e si trasferisce a Rieti. Insieme a lei continuerà ad effettuare esperimenti sul frumento.

L’attività dello scienziato prosegue e, avvalendosi delle leggi di Mendel, riesce a mettere a punto nuove varietà di frumento, sia tenero che duro. Tra queste ci sono il *Carlotta Strampelli*, cultivar di frumento tenero che prende il nome della moglie di Strampelli e che

viene presentata a Roma in occasione della "*Mostra delle novità agrarie*" del 1914. Questa varietà è, finalmente, resistente sia alle ruggini che all'allettamento. L'incrocio effettuato per ottenerla è Rieti x Massy, la prima originaria del centro Italia, l'altra è invece una varietà francese. Sarà grazie al *Carlotta Strampelli* che il genetista italiano riuscì a vincere, nel 1918, un riconoscimento "Premio Santoro", che gli conferisce fama internazionale.

L'anno successivo alla presentazione del *Carlotta Strampelli*, quindi nel 1915, venne presentato il ben noto *Senatore Cappelli*, varietà di frumento duro. Il nome è un omaggio al senatore Raffaele Cappelli, il quale permise a Strampelli di utilizzare dei terreni agrari in Puglia. L'importanza di questa cultivar di frumento duro è soprattutto legata al fatto che da esso derivano molte delle importanti varietà che vennero sviluppate nel secondo dopoguerra. Tra di esse c'è per esempio il Creso. Inoltre, il Senatore Cappelli è ancora utilizzato in agricoltura biologica.

Altre varietà note e prodotte da Strampelli sono *Ardito, Mentana, Villa Glori, Damiano Chiesa*. Molte di queste sono riconducibili a una cultivar orientale, *Akakomugi* (o frumento rosso), che aveva due caratteristiche distintive: la bassa taglia e la maturazione precoce. Grazie ad esso Strampelli fu in grado di dare origine a varietà che, oltre a possedere le due caratteristiche appena nominate, erano anche resistenti alle ruggini.

L' *Ardito* è uno dei principali successi di Strampelli. Venne ottenuto dall'incrocio del Rieti con una varietà olandese, nota per avere una produzione molto elevata, il *Wilhelmina*. Il risultato venne poi incrociato con l'*Akakomugi*. L'*Ardito* era resistente alle ruggini e al freddo, maturava circa 2 settimane prima degli altri frumenti duri e di bassa taglia, quindi meno soggetto all'allettamento. Aveva, inoltre, una produttività molto elevata.

I frumenti sviluppati da Strampelli permettono di incrementare di molto la produzione italiana di frumento, passando dai 4,4 milioni di tonnellate del 1922 a ben 8 milioni di tonnellate prodotti nel 1933, senza aumentare di molto la superficie coltivata. In questo modo riesce a vincere la cosiddetta "Battaglia del grano" (http://bressanini-lescienze.blogautore.espresso.repubblica.it/2010/03/22/il-senatore-cappelli-e-gli-altri-grani-di-nazareno-strampelli/). Strampelli vince così una delle sfide che gli stavano più a cuore, ovvero riuscire a migliorare la condizione dei contadini italiani. Questo successo non fu ottenuto solo direttamente tramite l'incremento della produzione, ma anche anticipando i tempi di raccolta del frumento, permettendo ai contadini che lavoravano in aree infestate

dalle zanzare di mietere prima che ci fosse il picco della diffusione delle zanzare stesse che causavano l'infezione da malaria.

La biologia molecolare ha poi identificato i geni che permisero ai frumenti di Strampelli di avere quelle determinate e importanti caratteristiche.

L'agronomo italiano ha sicuramente dei grandi meriti, i quali, secondo molti, gli sarebbero dovuti valere il premio Nobel per la pace. Decise anche di non brevettare mai le varietà da lui create, il che è rappresentativo del fatto che Strampelli decise di mettere a disposizione i frutti del suo lavoro di tutti. Il Nobel per la pace venne invece vinto, nel 1970, da Norman Borlaug, padre della rivoluzione verde, noto anche come "l'uomo che ha nutrito il mondo". Strampelli di certo anticipò e spianò la strada per il successo di Borlaug.

3 - LA CELIACHIA

Si ritiene che, nel I secolo d.C., il medico greco Areteo di Cappadocia fu il primo a descrivere la "diatesi celiaca". Areteo però non comprese le cause reali della patologia.

L'ulteriore passo in avanti documentato risale soltanto al 1888, quando l'inglese Samuel Gee fornì quella che viene considerata la prima descrizione della patologia celiaca. Il medico britannico scrisse:

There is a kind of chronic indigestion which is met with in persons of all ages, yet is especially apt to affect children between one and five years old. Signs of the disease are yielded by the faeces; being loose, not formed, but not watery; more bulky than the food taken would seem to account for; pale in colour, as if devoid of bile; yeasty, frothy, an appearance probably due to fermentation; stinking, stench often very great, the food having undergone putrefaction rather than concoction.

*(*Dowd e Walker-Smith, 1974*)*

Nel 1950, infine, il medico olandese Willem Karel Dicke (Figura 7) elaborò la prima dieta "*gluten-free*". Questo gli fu possibile perché, dopo aver analizzato i costituenti del frumento, riuscì ad identificare quali erano le frazioni dell'alimento che scatenavano la reazione avversa.

La scoperta di Dicke venne in qualche modo supportata dalla carestia che si verificò in Olanda nel 1944, l'"*Hogerwinter*", ovvero "inverno della fame". La carestia fu una delle conseguenze dall'occupazione tedesca del territorio e di un inverno particolarmente rigido che si verificò proprio nel 1944. Per queste ragioni ai pazienti dell'ospedale pediatrico "Juliana" venne fornita una dieta molto povera di pane e le condizioni di una parte dei bambini migliorarono notevolmente. Dicke in realtà aveva già sospettato un decennio prima che la causa della patologia, allora chiamata "*Gee-Herter-Syndrom*", potesse essere l'alimentazione a base di cereali. Questa sua intuizione venne quindi confermata da ciò che si verificò durante l'inverno della fame. (van Berge-Henegouwen e Mulder, 1993)

In seguito, e in realtà soprattutto negli ultimi anni, le conoscenze riguardo alla malattia celiaca sono diventate sempre di più e sempre migliori, sia a livello epidemiologico che patogenetico e clinico.

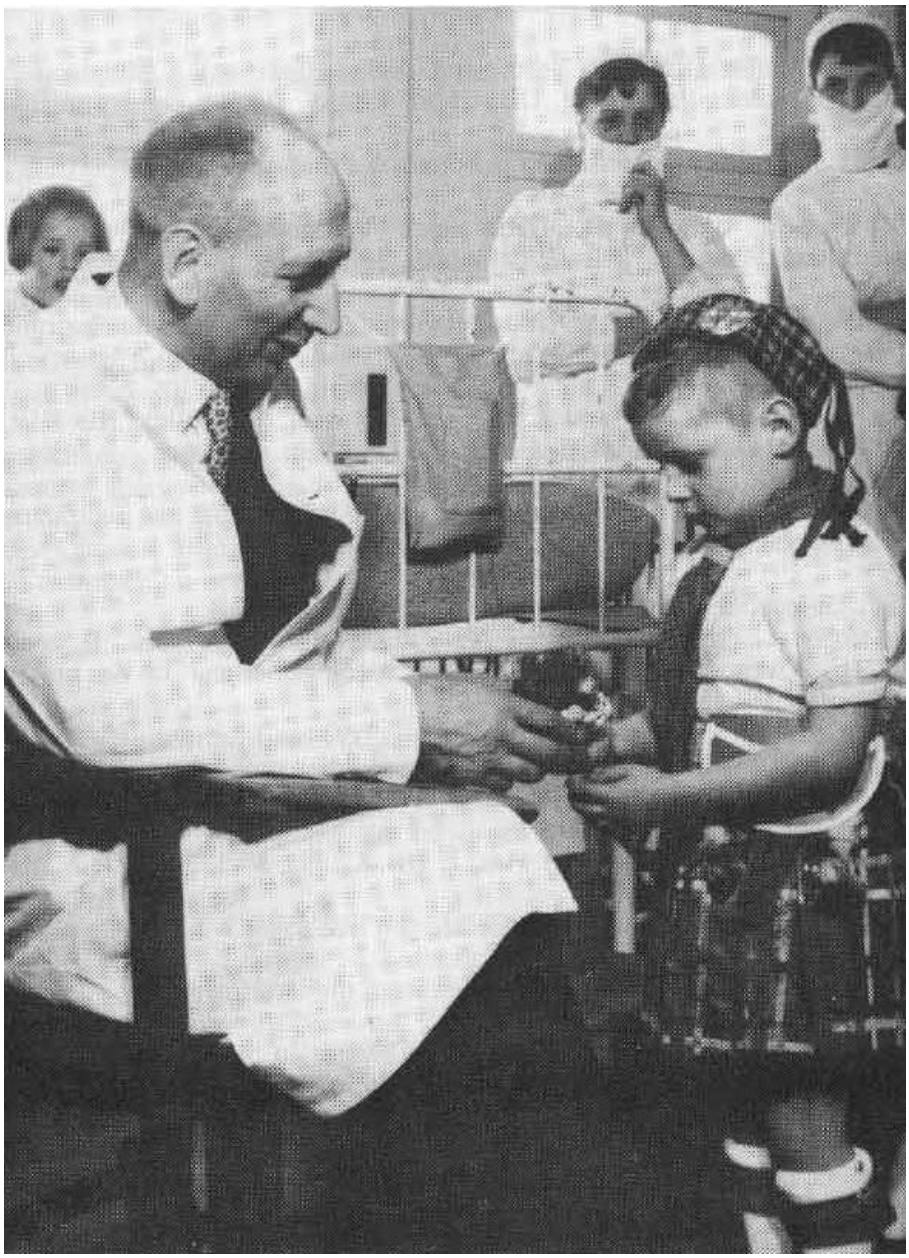

Figura 7 Willem-Karel Dicke

(Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1961, over 50 years of gluten free diet, van Berge-Henegouwen e Mulder, 1993)

3.1 - ASPETTI EPIDEMIOLOGICI – LA CELIACHIA IN ITALIA E NEL MONDO

La prevalenza della celiachia viene stimata a livello mondiale intorno all'1%. In Italia il sito "Epicentro" riporta che il numero stimato di celiaci sia di circa 600.000. I casi diagnosticati sono molti di meno: 183.000 circa nel 2017.

A partire dal 2007 il Parlamento italiano pubblica una relazione annuale contenente dati aggiornati riguardo alla diffusione della celiachia in Italia. Nel 2007 i casi diagnosticati erano 64.398, per passare ad essere 182.858 nel dicembre del 2016. Questo vertiginoso aumento si può ricondurre alle migliorie apportate alle tecniche diagnostiche e ad una maggiore sensibilità nei confronti della problematica.

Le regioni italiane con il maggior numero di pazienti celiaci residenti sono:

- Lombardia, 32.408 celiaci
- Campania e Lazio, 17.777 celiaci

(http://www.epicentro.iss.it/problemi/celiachia/epidItalia.asp)

Si stima che in Europa i celiaci siano circa 7 milioni. Questo vuol dire che all'incirca un europeo su 100 soffre di celiachia. Di questi soltanto un 25% riceve una diagnosi.

(http://www.aoecs.org/)

La distribuzione della patologia non è omogenea, confrontando infatti la frequenza tra stati europei si potrà notare che i dati riportano, per esempio, una frequenza dello 0,2% in Germania contro una frequenza tra il 2 e il 3% in paesi come la Finlandia e la Svezia (Figura 8).

Attualmente, generalizzando, la prevalenza dell'1% è riscontrabile a livello mondiale con dei picchi di frequenza, soprattutto tra la popolazione più giovane, in alcune aree del pianeta. È il caso della regione africana del Sahara occidentale, dove la frequenza della celiachia tra i bambini è tra le più alte al mondo: tra il 6 e il 7%.

(http://www.drschaer-institute.com/it/articoli-specialistici/la-mappa-mondiale-della-celiachia-1229.html)

Queste informazioni smentiscono il credo, generalmente diffuso, secondo il quale la celiachia è una patologia che affligge quasi soltanto gli europei caucasici. I dati emergenti indicano infatti che il fatto che la celiachia non venisse diagnosticata sia da ricondurre semplicemente a tecniche diagnostiche inadeguate, non all'assenza di casi. (Gujral et al., 2012)

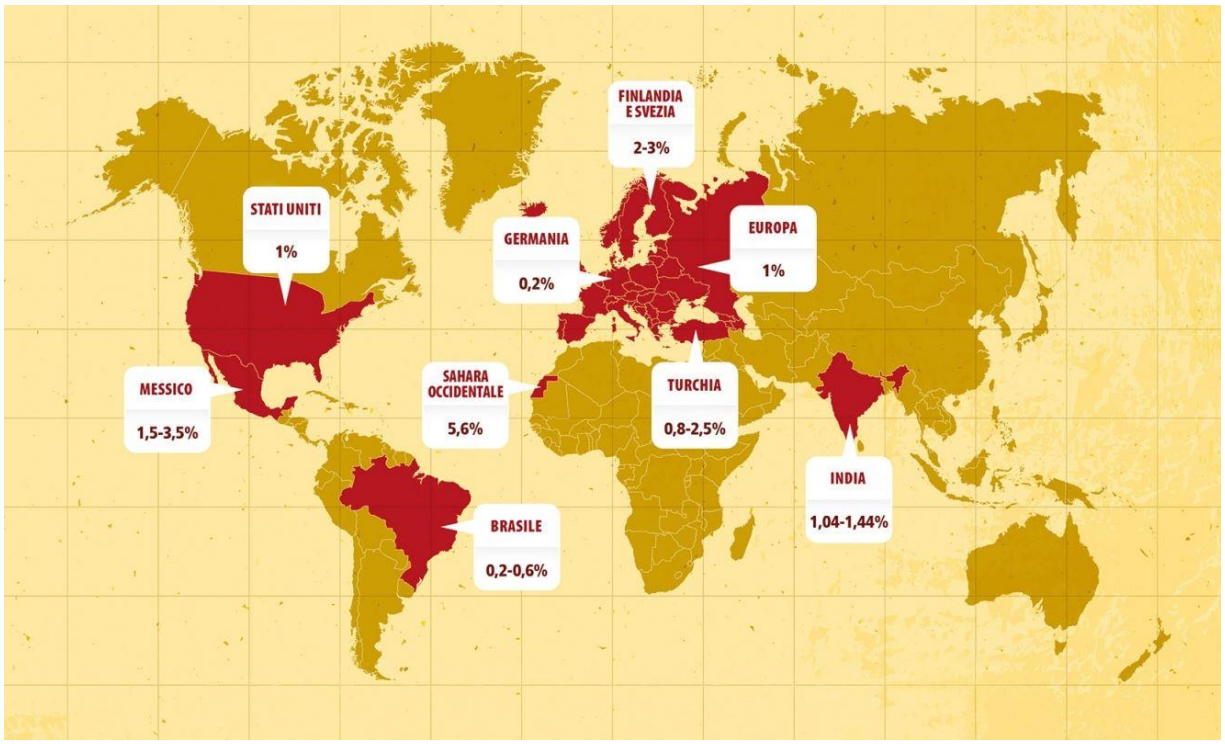

Figura 8 La celiachia nel mondo

(http://www.drschaer-institute.com/it/articoli-specialistici/la-mappa-mondiale-della-celiachia-1229.html)

3.2 - LA PATOLOGIA

Una rappresentazione grafica molto utilizzata per descrivere la celiachia è un iceberg (Figura 9). La parte emersa rappresenta i casi che presentano un quadro genetico caratterizzato da sierologia positiva, mutazioni HLA-DQ2 o DQ8 predisponenti, sintomi e lesioni gastrointestinali (endoscopia e biopsia).

La punta dell'iceberg purtroppo è molto piccola rispetto alla parte non emersa, la quale cela:

- La celiachia silente, HLA-DQ2 o DQ8, clinicamente asintomatica ma con biopsia e sierologia entrambe positive
- La celiachia latente, HLA-DQ2 o DQ8, asintomatica e soltanto sierologia positiva, ma mucosa intestinale nella norma
- La celiachia potenziale, con predisposizione genetica ma senza sintomi o lesioni alla mucosa

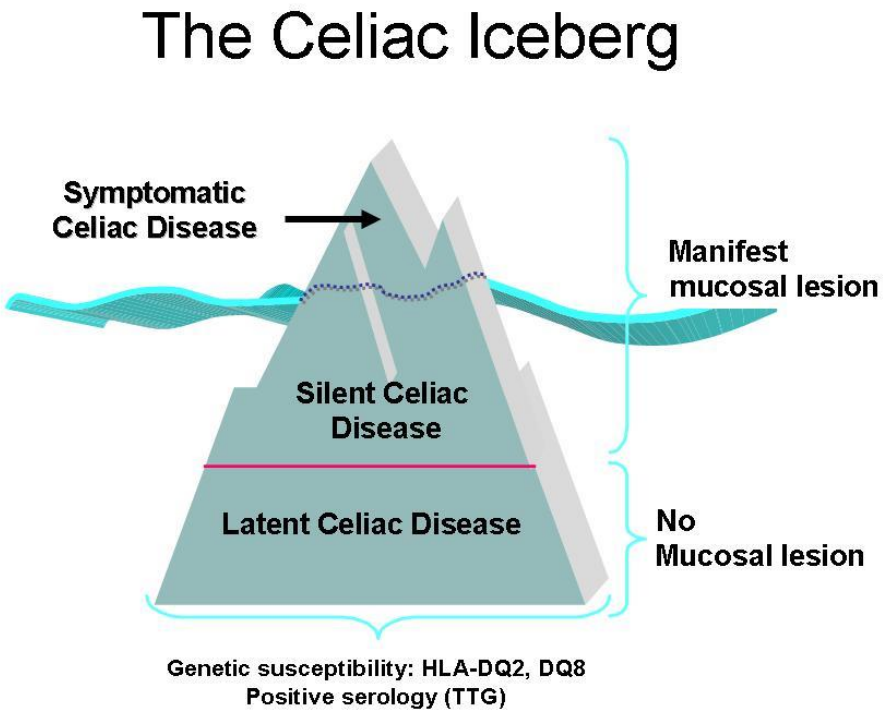

Figura 9 L'iceberg della celiachia

(http://www.thepatientceliac.com/2013/10/25/icds-2013-the-celiac-iceberg-revisited/)

La celiachia è l'intolleranza alimentare più diffusa al mondo. Si tratta di una patologia scatenata, nel soggetto geneticamente predisposto, dall'assunzione, tramite l'alimentazione, di una determinata frazione proteica di alcuni cereali. L'organo coinvolto dalla patologia sarà quindi l'intestino, conseguentemente all'introduzione e alla digestione delle proteine. Sono quindi due le importanti premesse da trattare prima di proseguire con la descrizione e caratterizzazione della patologia celiaca, ovvero:

- L'anatomia dell'intestino tenue
- La digestione e l'assorbimento delle proteine alimentari

3.3 - ANATOMIA DELL'INTESTINO

L'intestino, come tutto il tratto gastrointestinale, è rappresentato da un organo cavo, avente una parete costituita da 4 strati. Pur rimanendo la struttura di base la stessa ci sono delle caratteristiche peculiari di ciascun tratto.

La parete intestinale si compone, partendo dallo strato più interno, ovvero quello che si affaccia sul lume intestinale, di:

- Tonaca mucosa
- Tonaca sottomucosa
- Tonaca muscolare
- Tonaca sierosa

La tonaca mucosa è costituita, internamente, da uno strato di cellule epiteliali. Le cellule epiteliali vengono tenute in sede dalla lamina propria, costituita da tessuto connettivo. Al di sotto del tessuto connettivo c'è uno strato di muscolo liscio, la *muscolaris mucosae*.

Nell'intestino tenue la mucosa si ripiega a formare delle pliche. Sono inoltre presenti delle estroflessioni digitiformi, i villi intestinali, che si affacciano sul lume intestinale. La superficie intestinale è caratterizzata da delle invaginazioni che raggiungono il tessuto connettivo. Queste invaginazioni sono la sede delle cripte intestinali e di ghiandole sottomucose.

Le cellule epiteliali dell'intestino prendono il nome di enterociti. Sono cellule deputate al trasporto di sostanze, come i nutrienti che provengono dai processi digestivi. Le giunzioni che tengono unite le cellule intestinali non costituiscono una barriera solida. Alcune molecole, come per esempio l'acqua, possono essere assorbite anche per via paracellulare, ovvero non attraverso gli enterociti, ma passando tra di essi, proprio grazie alla porosità dell'epitelio intestinale. Le giunzioni sono modulabili, ovvero possono modificarsi in base a stimoli provenienti dall'organismo. Questa è una peculiarità che verrà affrontata anche in seguito, in quanto il modificarsi delle giunzioni intestinali è uno dei fattori caratteristici della celiachia.

Le cellule dell'epitelio intestinale hanno una vita di pochi giorni, proprio per le sollecitazioni continue alle quali questo tratto viene quotidianamente sottoposto. Le cellule staminali dell'intestino risiedono nelle cripte o delle ghiandole.

La lamina propria sottostante allo strato epiteliale è costituita da tessuto connettivo, all'interno del quale sono collocati piccoli vasi e fibre nervose. In questa sede i nutrienti completano il loro percorso di assorbimento, passando nel circolo sanguigno o linfatico. È sempre in questa sede che si trovano cellule immunitarie, quali linfociti e macrofagi. Il

compito di queste cellule è proteggere l'organismo da sostanze che riescono a penetrare nello strato sottostante all'epitelio.

Sempre in relazione alla difesa dell'organismo a livello intestinale sono presenti noduli e raggruppamenti di tessuto linfatico: le placche di Peyer. Sono una parte del tessuto linfatico associato all'intestino, il GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) (Figura 10).

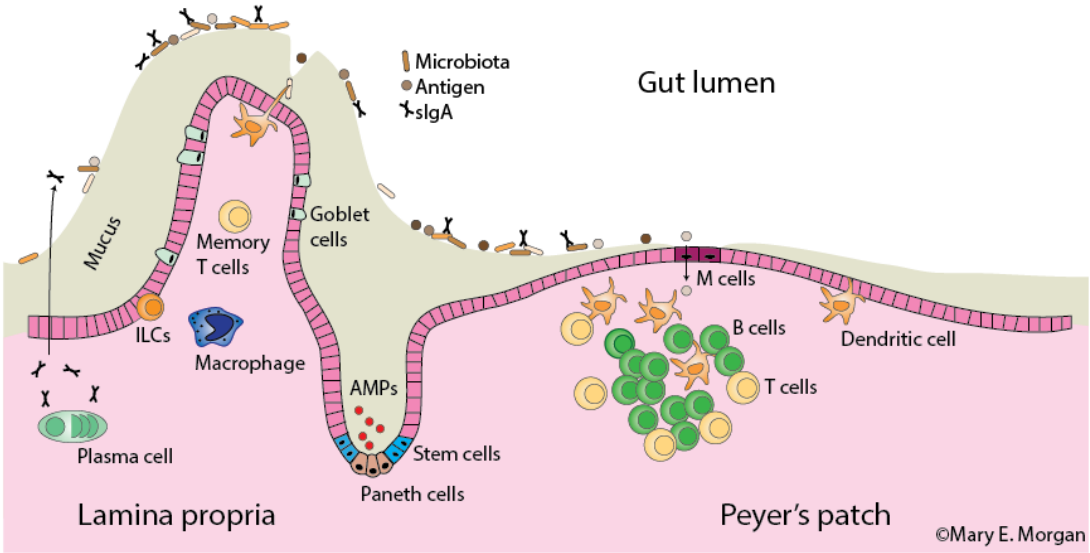

Figura 10 Il GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue)

(http://theibdimmunologist.com/learning/the-immune-system-in-the-healthy-gut)

La motilità dei villi è garantita dalla presenza dell'ultimo strato della mucosa, la *muscolaris mucosae*.

La sottomucosa contiene vasi sanguigni e vasi linfatici di calibro maggiore rispetto a quelli presenti nella lamina propria. In questa sede è presente anche il plesso sottomucoso, una importante rete nervosa del sistema nervoso enterico.

La tonaca mucosa permette la motilità intestinale. È costituita da due strati di tessuto muscolare liscio. Uno, più interno, con decorso circolare, l'altro, più esterno, con decorso longitudinale. Tra i due strati muscolari è presente il plesso mioenterico, l'altra importante componente del sistema nervoso enterico.

Esternamente, infine, è presente la sierosa. Si tratta di una membrana di tessuto connettivo. Questa membrana è in continuità con la membrana peritoneale, la quale riveste la cavità addominale.

Come descritto sopra, al tratto gastrointestinale è associato il sistema immunitario. L'intestino viene considerato il più grande organo linfoide del nostro corpo, ad esso sono associati un gran numero di linfociti e anticorpi. La necessità, da parte dell'organismo, di difendersi a questo livello è facilmente comprensibile. L'apparato digerente è un punto di ingresso di sostanze introdotte dall'esterno, insieme agli alimenti. Con il cibo si possono assumere sostanze patogene e non patogene, ed è importante che ci sia un sistema di riconoscimento che permetta al corpo di discernere tra ciò che è dannoso e ciò che non lo è, come per esempio gli antigeni di origine alimentare non patogeni.

Le difese dell'intestino sono sia naturali che innate.

I linfociti dell'apparato digerente sono distribuiti a tre livelli:

- Linfociti intraepiteliali
- Linfociti della lamina propria
- Linfociti presenti a livello delle placche di Peyer

I primi, i linfociti presenti all'interno delle cellule epiteliali, sono prevalentemente linfociti del tipo CD8+ (CTL).

All'interno della lamina propria sono invece presenti macrofagi, cellule dendritiche, eosinofili, mastociti, linfociti soprattutto del tipo CD4+ (Th).

Nelle placche di Peyer sono presenti linfociti del tipo CD8+ e CD4+, linfociti T e B, macrofagi, cellule dendritiche.

Il sistema linfoide associato all'intestino sembra poter essere sollecitato da eccessi o deficienze nutrizionali, le quali possono condurre a risposte anomale da parte del GALT.

(Costantini et al., 2016)

3.4 - LA DIGESTIONE DELLE PROTEINE

Le proteine introdotte con gli alimenti sono rappresentate da peptidi costituiti da almeno 20 amminoacidi. Le differenze tra le varie proteine sono determinate sia dalla composizione in amminoacidi, sia dalla loro struttura. Alla base della digeribilità delle proteine, ovvero la

loro suscettibilità all'idrolisi enzimatica, ci sono proprio queste caratteristiche. Più nello specifico la digeribilità dipenderà:

- Dall'interazione tra gli amminoacidi e altre componenti
- Dalla natura delle proteine, se sono di origine animale o vegetale
- Dalle modificazioni subite dalle proteine a fronte delle trasformazioni tecnologiche a cui è stato sottoposto l'alimento (per esempio trattamenti termici)
- Dalla presenza di componenti con maggiore resistenza all'azione enzimatica

Gli enzimi responsabili della digestione delle proteine sono le peptidasi (o proteasi), presenti sia a livello gastrico che a livello intestinale. L'azione della pepsina a livello gastrico è più blanda rispetto all'azione di quella presente a livello intestinale, agisce infatti su circa il 20% delle proteine introdotte. La pepsina viene secreta sotto forma di pepsinogeno, ovvero nella forma non attiva, da parte della mucosa gastrica. Il pepsinogeno viene attivato a pepsina dal basso pH presente a livello gastrico. Lo stomaco non rappresenta il sito di assorbimento degli amminoacidi e oligopeptidi generati dall'azione digestiva degli enzimi. Il chimo parzialmente digerito nello stomaco passa nell'intestino. La pepsina, che ha iniziato la digestione delle proteine a livello gastrico, viene inattivata dal pH basico presente a livello intestinale. Nel lume intestinale intervengono proteasi pancreatiche e intestinali, le quali agendo sulle proteine generano peptidi di dimensioni inferiori e qualche amminoacido libero. Tra questi enzimi c'è, per esempio, la tripsina. Anche in questo caso l'enzima non viene secreto nella sua forma attiva, bensì sotto forma di tripsinogeno. Sarà poi l'azione dell'enteropeptidasi intestinale a generare la forma attiva.

Gli enzimi presenti nell'intestino possono essere divisi in due grandi categorie:

- Endopeptidasi
- Esopeptidasi

Questa suddivisione viene fatta in base a dove è collocato il sito bersaglio di questi enzimi. Le prime, ovvero le endopeptidasi, agiranno all'interno della catena peptidica, formando frammenti più o meno grandi. Le esopeptidasi agiscono invece alle estremità della catena, staccando singoli amminoacidi.

A completare l'idrolisi, con una ulteriore riduzione della dimensione dei peptidi, sarà la peptidasi presente a livello apicale degli enterociti. Questo enzima genererà di- e tripeptidi, i quali verranno assorbiti tramite sistemi di trasporto con alta specificità per il substrato.

L’assorbimento delle proteine avviene a livello dell’intestino tenue grazie alla presenza di sistemi di trasporto multipli, la cui presenza è resa necessaria dalla grande varietà di prodotti che possono formarsi tramite i processi digestivi. Gli amminoacidi introdotti con l’alimentazione sono infatti 20, i quali possono dare 400 combinazioni differenti quando presenti sotto forma di dipeptidi e 8000 combinazioni differenti quando presenti sotto forma di tripeptidi.

Gli amminoacidi liberi verranno prevalentemente trasportati da proteine in cotrasporto con il Na+, oppure tramite trasportatori H+ dipendenti.

I piccoli peptidi (di- e tripeptidi) vengono invece trasportati in larga parte dal cotrasportatore *Pept1*, che è H+ dipendente.

In ultimo, per completezza, va detto che possono essere assorbiti anche oligopeptidi costituiti da 3 o più amminoacidi. Questi possono agire come antigeni e svolgere quindi un ruolo nelle allergie alimentari.

Il processo di assorbimento si conclude con il passaggio di amminoacidi e piccoli oligopeptidi nel circolo sanguigno, tramite diffusione nei capillari della mucosa intestinale.

All’interno dell’enterocita, a livello citosolico, sono presenti peptidasi citosoliche, le quali vanno ad idrolizzare ulteriormente i frammenti proteici assorbiti.

Quello appena descritto è il processo digestivo ed assorbitivo generale delle proteine nel soggetto sano.

(Costantini et al., 2016)

3.5 – PATOGENESI

La celiachia è una enteropatia intestinale (Gujral et al., 2012) determinata da una serie di fattori. Nello specifico questi fattori sono:

- Trigger ambientale rappresentato dalle prolamine
- Predisposizione genetica
- Incrementata permeabilità della parete intestinale

La reazione avversa è scatenata dall'assunzione di glutine. Il glutine è un complesso proteico presente in frumento, orzo, avena, segale, fatto, triticale, spelta e khorasan. Il glutine è costituito da due componenti:

- La prolamina
- La glutenina

Nello specifico è la prolamina a determinare problemi nel soggetto predisposto. La prolamina assume un nome differente in base al cereale al quale ci si riferisce. Avremo quindi:

- Nel frumento la gliadina
- Nell'orzo l'ordeina
- Nella segale la secalina
- Nell'avena l'avenina

Circa il 50% del glutine è rappresentato dalla prolamina.

Essendo una componente del glutine responsabile, almeno in parte, del presentarsi della celiachia numerosi studi si sono focalizzati sull'argomento.

La componente genetica nella celiachia è piuttosto rilevante. Ad oggi la patologia risulta essere correlata ad alleli HLA (*Human Leukocyte Antigen*) e a più di 250 altri geni, sia MCH (*Major Histocompatibility Complex*) che non MCH. Il coinvolgimento della genetica è testimoniato anche dal fatto che la patologia colpisce spesso, nei gemelli omozigoti, entrambi. (Gujral et al., 2012)

I loci coinvolti ed individuati finora sono:

- CELIAC1 sul cromosoma 6 (geni HLA-DQ2 e HLA-DQ8)
- CELIAC2 sul cromosoma 5q31-33
- CELIAC3 sul cromosoma 2q33 (contiene i geni regolatori dei linfociti T CD28, CTLA4 e ICOS)
- CELIAC4 sul cromosoma 19p13.1 (gene miosina IXB, MYO9XB)

Ci sono anche delle differenze individuate studiando la genetica di persone che provengono da diverse parti del mondo. In pazienti provenienti dai Paesi Bassi risultano, tra quelli coinvolti, anche i geni delle giunzioni strette PARD3 e MAGI2. Gli stessi geni tra l'altro sono presenti anche in pazienti con colite ulcerosa, suggerendo una connessione tra le due

patologie. In associazione alla malattia è stato trovato, in Algeria, Iraq e Turchia anche il gene HLA B8, espresso dal sistema maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex - MCH*) I. (Gujral et al., 2012)

Il fattore genetico principale è quello rappresentato dai geni HLA-DQ, cioè i geni che codificano DQ2 e DQ8 nel complesso HLA su 6p21. Il 90% dei malati di celiachia presenta l'aplotipo DQ2, il restante 10% presenta invece l'aplotipo DQ8. Il DQ2 risulta essere composto da DQB1*302 e DQA1*03 quasi nella totalità dei casi (Gujral et al., 2012).

Il 30% della popolazione caucasica è portatrice di HLA-DQ2, la maggior parte di questi mangeranno frumento ma soltanto 1 su 100 svilupperà la celiachia. La restante suscettibilità si pensa sia dovuta a una combinazione di fattori genetici ed ambientali.

La presenza di HLA-DQ2.5 è necessaria affinché si sviluppi la patologia ma non è una condizione sufficiente. C'è una combinazione di altri fattori genetici che influenzano la barriera mucosale, il sistema immunitario innato ed adattativo. L'ingestione di frumento è il trigger ambientale necessariamente presente perché la patologia si presenti però, a capo di questa ci sono una serie di altri fattori come il periodo della vita in cui il glutine viene introdotto nell'alimentazione e l'allattamento al seno.

La prevalenza della celiachia in pazienti con DM T1 diagnosticato è stata stimata essere tra il 15% nei bambini e 6% negli adulti. La ragione per questa associazione non è mai stata chiarita del tutto, ma comuni meccanismi di patogenetici e genetici sembrano esserne la causa. La regione IL-21 mostra associazione tra celiachia e DM T1, la malattia di Grave e l'artrite psoriasica, ma il coinvolgimento della genetica in queste condizioni patologiche non è stata ancora del tutto compresa (Gujral et al., 2012).

L'epitelio intestinale modula il sistema immunitario intestinale, il quale è profondamente alterato da parte della gliadina. La gliadina può accedere alla membrana basale dell'epitelio e interagire direttamente con il sistema immunitario, sia tramite la via trans che paracellulare.

Nell'articolo "*Celiac disease: Demography, diagnosis, pathogenesis and treatment*" Gujral et a. (2012) trattano anche questo aspetto.

L'accesso tramite la via transcellulare alla membrana basale è permessa dalla sovra espressione del recettore di trasferimento CD71.

Per quanto riguarda la penetrazione tramite la via paracellulare il ruolo più rilevante è quello ricoperto dalla zonulina. Questa proteina è responsabile dell'incrementata permeabilità intestinale. Nel celiaco i livelli sierici di zonulina risultano incrementati.

La zonulina viene rilasciata da parte degli enterociti. Lo stimolo che ne provoca la secrezione è l'esposizione apicale all'ingestione di alfa-gliadina.

La gliadina si lega tramite al recettore CXCR3 agli enterociti e conseguentemente la proteina MyD88 induce il rilascio di zonulina. La gliadina potrà a questo punto raggiungere lo strato sottostante la barriera mucosale penetrando tra gli enterociti.

Dopo aver legato il recettore di superficie il glutine viene internalizzato e conseguentemente stimolerà una serie di eventi intracellulari, tra cui l'attivazione di fosfolipasi C (PLC) e della proteina chinasi Ca, la polimerizzazione di actina, la quale induce l'apertura delle giunzioni strette tramite il recettore Zot/Zolulina.

La deamidazione dei peptidi del glutine da parte di tTG tissutali rinforza la presentazione dei peptidi da parte di molecole HLA-DQ2 o HLA-DQ8 alle cellule T, il che attiva le cellule glutine reattive Th1 e produce elevati livelli di citochine infiammatorie. IL-21 è sovraprodotto nella mucosa dei celiaci, dove aiuta l'espressione di T-bet e la produzione di IFN-γ.

3.6 - LA COMPONENTE AUTOIMMUNE

Il ruolo della componente autoimmune nella patogenesi della celiachia viene descritta in modo esaustivo nell'articolo "*Celiac disease: Demography, diagnosis, pathogenesis and treatment*" Gujral et al. (2012).

La celiachia è una patologia autoimmune associata alla predisposizione genetica HLA e con l'enzima transglutaminasi tissutale (tTG), l'autoantigene del morbo celiaco.

tTG è un enzima calcio dipendente ha un ruolo principale nella patogenesi della malattia in quanto media una ordinata e specifica deamidazione delle gliadine, creando un epitopo che lega efficacemente DQ2 ed è riconosciuto da cellule T derivate dall'intestino. Gli autoanticorpi tTG vengono prodotti dalla mucosa del piccolo intestino quando viene ingerito glutine con gli alimenti.

I sintomi della celiachia extraintestinali potrebbero essere associati con i depositi di immunoglobulina A (IgA) sul tTG extracellulare nel fegato, nei reni, nei nodi linfatici e muscoli dei pazienti.

I peptidi tossici, come il 19-mer, innescano una risposta immune innata, caratterizzata dalla produzione della citochina interleuchina 15 (IL-15) da parte delle cellule epiteliali e cellule dendridiche della lamina propria. Ci sono evidenze sperimentali che indicano che questa non sia una risposta limitata a chi è affetto da celiachia, riguarda anche persone non celiache. La differenza sta nel fatto che nel celiaco tale risposta è maggiore, amplificata.

L'interleuchina 15 agisce sulla barriera epiteliale, sia andando ad agire sulle giunzioni strette ed incrementando, conseguentemente, la permeabilità intestinale, sia agendo sui linfociti intraepiteliali, promuovendo così la produzione di interferon-γ e fungendo da potente citotossico. I peptidi immunotossici, come il 33-mer, possono raggiungere la lamina propria dove sono esposti sulle superficie delle cellule dendridiche, inducendo l'attivazione delle cellule T specifiche per il glutine.

Altri autoantigeni possono essere attivati in risposta al processo infiammatorio causato dalla gliadina e causare anch'essi una risposta autoimmune. La continua stimolazione da parte di citochine pro-infiammatorie, come interferone γ e *tumor necrosis factor* α (IFN-γ e TNF-α), possono causare l'ulteriore processamento di autoantigeni e la loro presentazione a linfociti T da parte di cellule presentanti l'antigene. La mucosa intestinale sarà composta da un numero maggiore di cellule, sia nel compartimento intraepiteliale, sia a livello della lamina propria. Le cripte intestinali risulteranno elongate a causa di un maggior numero di cellule epiteliali in divisione. I villi invece risultano accorciati o completamente assenti a causa di una rapida perdita di cellule epiteliali mature (Figura 11).

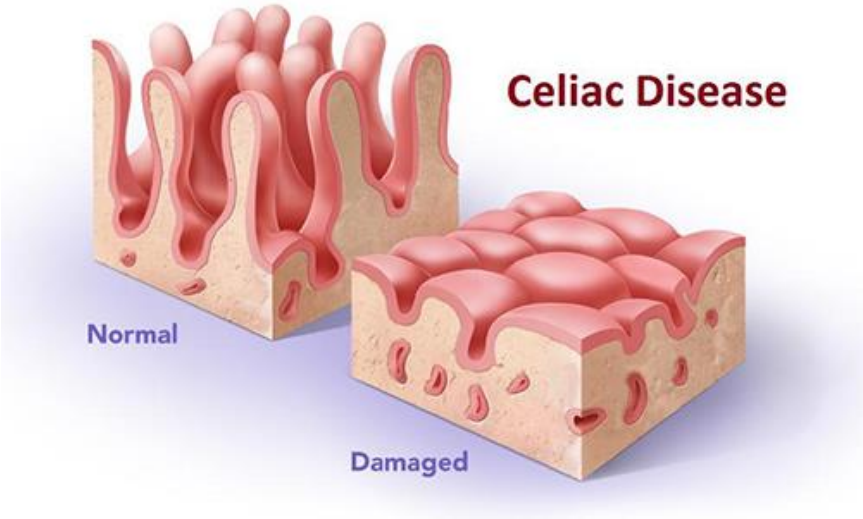

Figura 11 Confronto tra mucosa intestinale nel soggetto sano e mucosa intestinale nel celiaco

(https://www.glutenfreetherapeutics.com/living-gluten-free/medicine-research/chronic-inflammation/)

3.7 – DANNO ALLA MUCOSA INTESTINALE

I peptidi risultanti dalla digestione del glutine possono raggiungere lo strato sottostante gli enterociti tramite la via paracellulare, la via transcellulare oppure tramite retrotranscitosi.

La transglutaminasi tissutale (tTG) incentiva la presentazione dei peptidi glutine derivati da parte delle cellule dendridiche alle cellule CD4+. Il background, da parte del punto di vista genetico, vede la presenza di molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8.

Le cellule CD4+ attivate, reattive al glutine, producono un'elevata quantità di citochine infiammatorie. Il pattern delle cellule T-*helper* 1 (Th-1) sarà dominato dall'interferone γ. Le citochine Th-1 promuovono gli effetti dell'infiammazione, tra cui la secrezione di fibroblasti e di cellule mononucleari della lamina propria da parte delle metalloproteinasi (*metalloproteinases*, MMPs). Una delle conseguenze è la degradazione della matrice extracellulare e della membrana basale, la quale rappresenta l'interfaccia tra il tessuto connettivo e lo strato epiteliale. Tra le conseguenze c'è anche la maggiore citotossicità dei linfociti intraepiteliali (*intraepithelial lymphocytes*, IELs) o delle cellule *natural killer* (NK). Le cellule NK facilitano la morte per apoptosi degli enterociti dell'intestino. L'interferone α (IFN- α), secreto dalle cellule dendridiche, induce le cellule CD4+ T a rilasciare interferone

γ. In aggiunta a questo, tramite la produzione di citochine Th-2, le cellule CD4+ T attivate stimolano l'attivazione e l'espansione clonale delle cellule B, le quali si differenziano in cellule plasmatiche e producono antigliadina e anticorpi anti-tTG. Gli autoanticorpi tTG si depositano a livello della membrana basale, e potrebbero così indurre delle modifiche al citoscheletro degli enterociti, con ridistribuzione dell'actina e conseguente danno epiteliale (Figura 12).

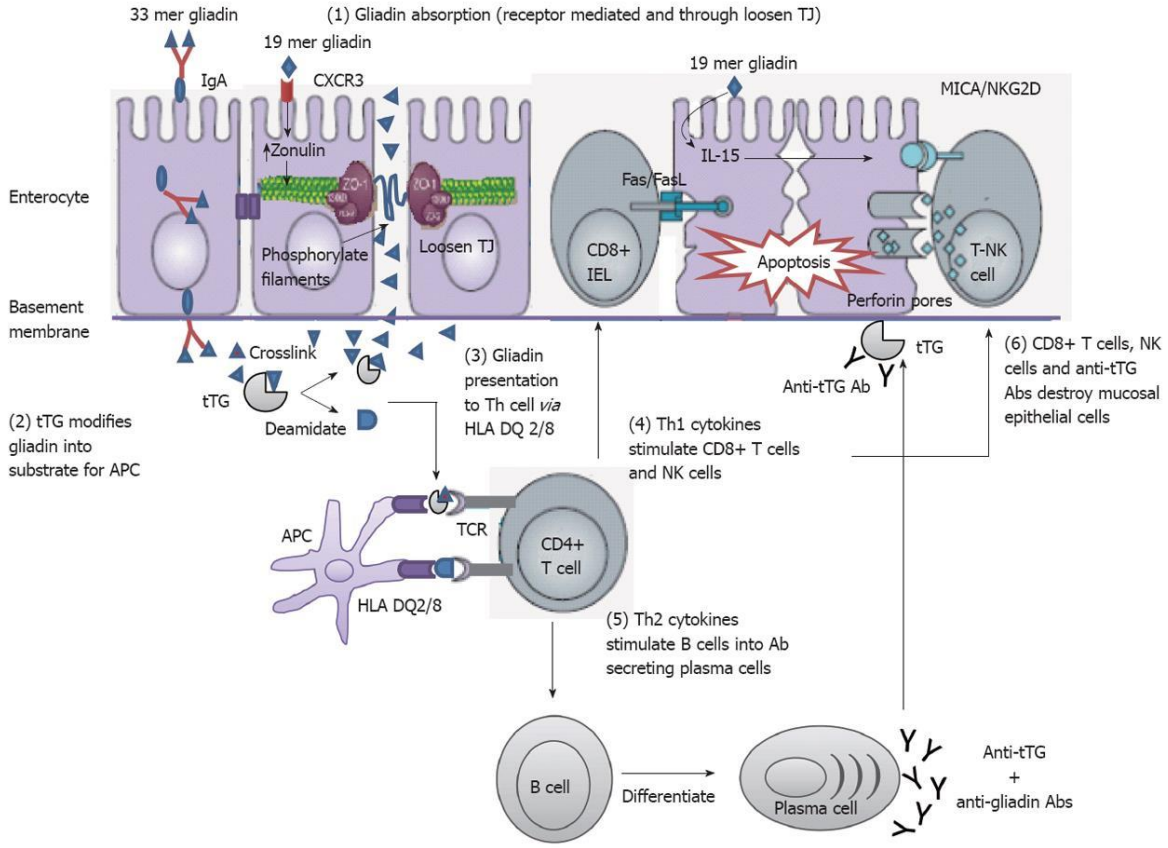

Figura 12 Il meccanismo del danno intestinale nella celiachia

(https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v18/i42/6036.htm)

3.8 - SINTOMATOLOGIA E PATOLOGIE ASSOCIATE

I sintomi con cui si presenta la celiachia sono vari e sia di tipo gastrointestinale che sistemici (Figura 13).

Tra i sintomi gastrointestinali ci sono:

- Dolore addominale ricorrente
- Gonfiore
- Flatulenza
- Diarrea cronica
- Costipazione

Tra i sintomi non gastrointestinali ci sono:

- Anemia persistente
- Astenia
- Perdita di peso
- Osteopenia e osteoporosi
- Fratture
- Amenorrea
- Infertilità
- Crampi muscolare
- Perdita di smalto dentale

Tra i sintomi più diffusi ci sono l'anemia, ovvia conseguenza del danno a livello della mucosa intestinale, e quindi problemi di assorbimento dei micro e macronutrienti. Riconducibile a questo è anche la perdita di peso, e nei casi più estremi, la conseguente anoressia.

Altri sintomi diffusi sono il dolore e il gonfiore a livello addominale e la diarrea. Importante è ricordare che uno dei possibili sintomi della celiachia è anche la costipazione, nonostante sia diffusa la sbagliata credenza che la celiachia sia associata solo a diarrea.

Ci sono alcune complicazioni di natura autoimmune che sono spesso associate alla celiachia. Tra queste ci sono:

- Dermatite erpetiforme

- Tiroidite autoimmune
- Neuropatia periferica
- Epilessia
- Sindrome di Sjögren
- Artrite reumatoide
- Afte

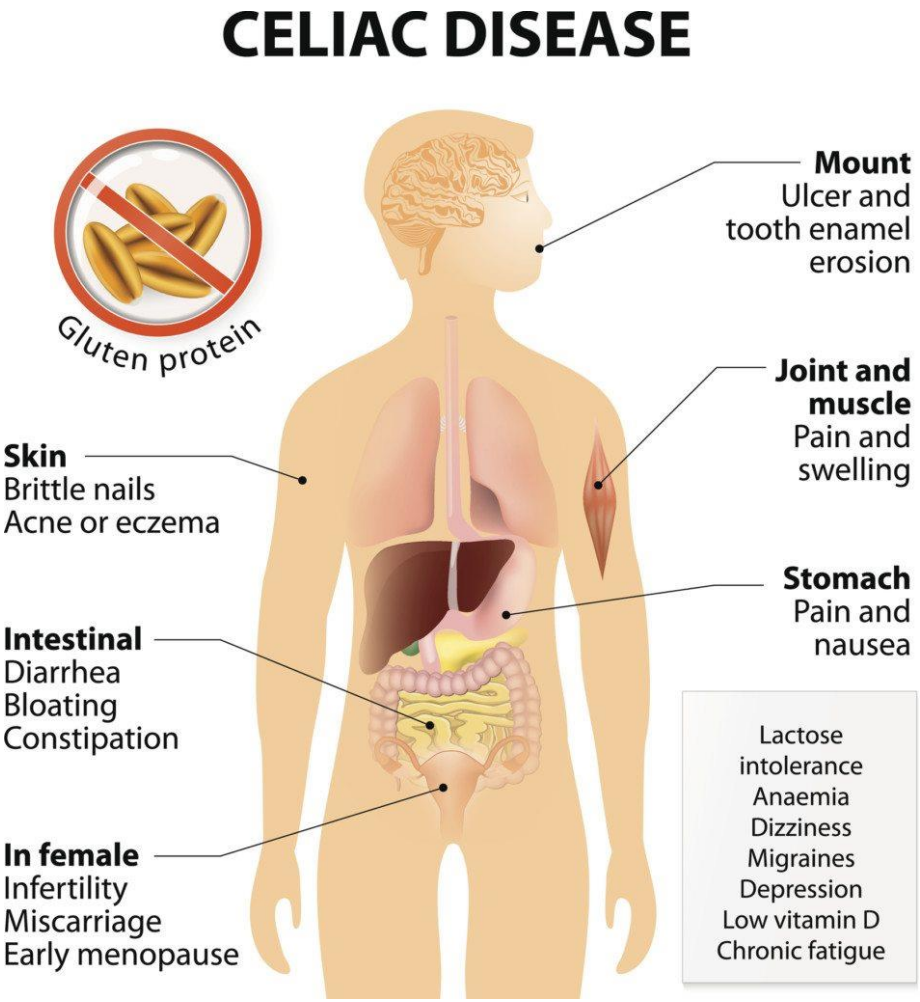

Figura 13 Sintomi gastrointestinali e sistemici della celiachia

(https://universityhealthnews.com/daily/gluten-free-food-allergies/celiac-disease-symptoms/)

3.9 - DIAGNOSI, FOLLOW-UP E TERAPIA

Il protocollo diagnostico per l'adulto indica che, in caso di sintomi (sia classici che atipici) e sierologia positiva alla celiachia, venga effettuata una biopsia intestinale per confermare la diagnosi (Figura 14).

In età pediatrica e adolescenziale si può non ricorrere alla biopsia quando si ha positività agli anticorpi anti-tTG IgA superiori al valore soglia di almeno 10 volte, positività per gli EmA IgA (antiendomiso) e un quadro genetico compatibile con il presentarsi della malattia (HLA-DQ2, HLA-DQ8).

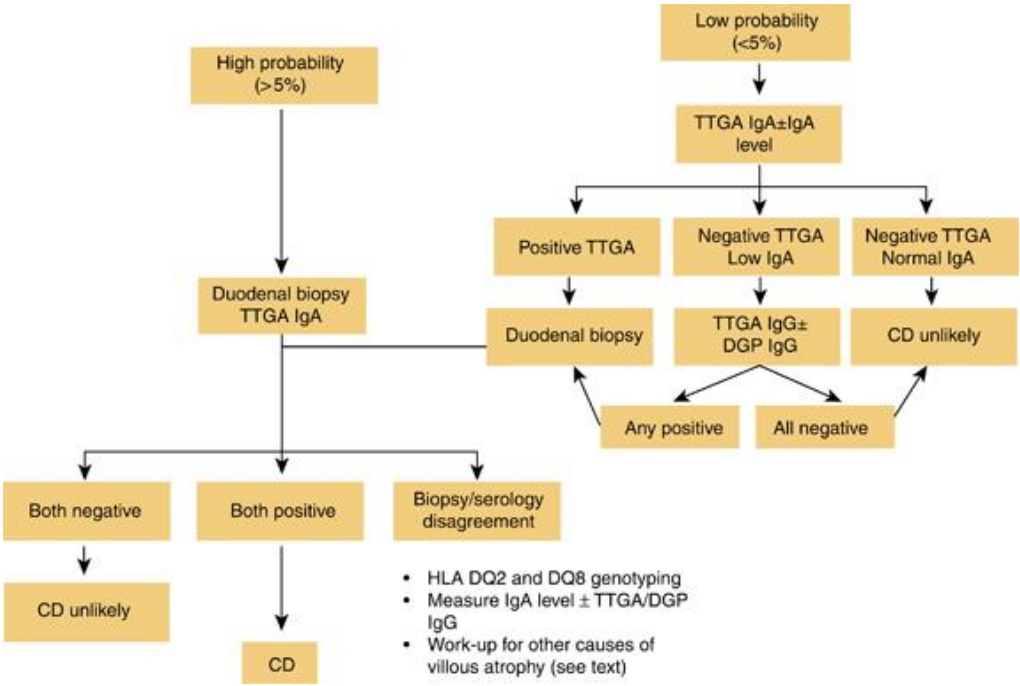

Figura 14 Diagnosi della celiachia

(https://gi.org/guideline/diagnosis-and-management-of-celiac-disease/)

Il follow-up prevede il controllo della densità ossea tramite la MOC (densitometria ossea) a 18 mesi dall'inizio della dieta priva di glutine. Questo esame va ripetuto in caso i valori risultino non nella norma.

Alla diagnosi va eseguito anche il dosaggio del TSH (ormone tireostimolante), insieme a quello degli anticorpi anti TPO (antiperossidasi tiroidea). Entrambi gli esami andranno ripetuti ogni 3 anni.

(http://www.celiachia.it/AIC/AIC.aspx?SS=351&M=863)

L'unica terapia oggi disponibile per il celiaco è la completa astensione dal consumo di alimenti contenenti glutine.

Il *Codex Alimentarius* stabilisce che un alimento può essere considerato privo di glutine quando il contenuto di quest'ultimo nella matrice alimentare è inferiore allo 0,3%.

4 - LA SENSIBILITA' AL GLUTINE

La sensibilità al glutine viene definita da Fasano et al. (2015) come una intolleranza al glutine o ad altri componenti del frumento senza che ci sia un danno a livello intestinale, dove per intolleranza alimentare si intende una risposta fisiologia anormale provocata dall'ingestione di un alimento o un additivo alimentare che può coinvolgere il sistema immunitario. Le intolleranze possono essere divise in idiosincratiche, metaboliche, farmacologiche e tossiche.

La sensibilità al glutine è un disturbo noto già dagli anni '70 e '80 dello scorso secolo conosciuto anche con le i nomi di *gluten sensitivity* (GS), *gluten hypersensitivity* e *non-celiac gluten intolerance*. Il nome *gluten sensitivity* venne proposto nel 2011 da membri del *First Expert Meeting* riguardo alla sensibilità al glutine. Successivamente questo nome venne modificato con quella che è nota come definizione di Oslo, ovvero *non-celiac gluten sensitivity* (Czaja-Bulsa, 2014). Le testimonianze risalenti a circa 30 anni fa parlano di casi di pazienti che lamentavano la comparsa di sintomi avversi in seguito all'assunzione di glutine. Tali sintomi scomparivano del tutto una volta eliminato il glutine dall'alimentazione (Lebwohl et al., 2015).

I sintomi possono presentarsi sia a livello intestinale che extra intestinale. I più comuni sono:

- Dolore a livello addominale
- Gonfiore addominale
- Flatulenza
- Diarrea
- Disordini neurologici
- Dolore alle articolazioni
- Astenia
- Confusione mentale
- Cefalea

In genere, prima di arrivare alla diagnosi di *gluten sensitivity* si escludono patologie che sono caratterizzate da sintomi simili, i quali compaiono sempre in associazione al consumo di glutine, ovvero la celiachia e l'allergia al frumento.

A livello della mucosa intestinale di chi è afflitto da sensibilità al glutine sembra esserci attivazione del sistema immunitario della mucosa (Lebwohl et al., 2015) mentre la permeabilità della mucosa sembra essere inalterata e le lesioni a livello degli enterociti, se presenti, sembrano essere minori (Czaja-Bulsa, 2014).

4.1 - DIFFUSIONE

Le persone che riportano sintomi negativi in seguito all'assunzione di glutine e che per tale ragione decidono di eliminare dalla propria alimentazione i cibi contenenti glutine sono una percentuale non trascurabile della popolazione a livello mondiale. In Gran Bretagna un'indagine effettuata tramite compilazione di un questionario ha rivelato che di 1002 intervistanti il 13% ha affermato di avere reazioni avverse in seguito all'assunzione di glutine e il 3,7% ha affermato di seguire una dieta *gluten-free* (Lebwohl et al., 2015). Un'indagine simile è stata eseguita in Australia dove le persone intervistate sono state 1184. Il 7,3% degli intervistati ha risposto di aver notato effetti avversi dovuti all'ingestione di glutine ma la maggior parte di questi non ha nessun referto medico che possa sostenere questa affermazione (Lebwohl et al., 2015). In Italia uno studio che ha coinvolto numerosi centri ha coinvolto 12255 soggetti e anche qui, tra gli intervistati, un numero rilevante di persone, leggermente di più rispetto ai celiaci, ha indicato di soffrire di sensibilità al glutine (Lebwohl et al., 2015).

La sensibilità al glutine è più diffusa tra la popolazione femminile e tra gli anziani (Lebwohl et al., 2015). Metà dei pazienti a cui viene diagnosticata la NCGS presentano i geni che codificano le molecole DQ8 e DQ2 nel loro sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), geni presenti nel 95% dei celiaci (Czaja-Bulsa, 2014).

La sensibilità al glutine sembra essere correlata da alcuni studi alla sindrome dell'intestino irritabile (IBS – *Irritable Bowel Syndrome*). Uno studio australiano randomizzato a doppio cieco, i cui partecipanti erano persone che avevano effettuato autodiagnosi di IBS, hanno segnalato l'incremento dei sintomi assumendo cibi contenenti glutine rispetto a quelli che assumevano il placebo (68% contro il 40%) (Lebwohl et al., 2015). Sempre nell'ambito di uno studio scientifico, il quale ha coinvolto 37 persone affette da sindrome dell'intestino irritabile sensibile al glutine, è stato osservato che l'effetto dovuto all'assunzione di glutine veniva annullato limitando l'assunzione di alcune categorie di alimenti, i così detti

FODMAPs (*fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols*) (Lebwohl et al., 2015).

4.2 - LA DIAGNOSI

La problematica principale nel porre diagnosi di sensibilità al glutine è trovare dei parametri diagnostici che non siano condivisi con l'allergia al frumento e la celiachia. In ogni caso, prima di arrivare a diagnosi, andrebbero escluse sia la celiachia che l'allergia al frumento. Dopodiché si potrà verificare, facendo assumere del glutine al paziente, la comparsa dei sintomi. I sintomi, nel caso della sensibilità al glutine, si presentano a distanza di molte ore se non di giorni dall'ingestione del glutine, a differenza di quello che succede in caso di allergia al frumento, dove i sintomi compaiono nell'arco di 2 ore in seguito al consumo di frumento (Lebwohl et al., 2015). Non sono stati sviluppati protocolli diagnostici, per ora, e non esistono nemmeno dei marker specifici da andare a ricercare in caso di sospetta sensibilità al glutine. Gli unici anticorpi individuati e correlati a questa condizione sono gli anticorpi antigliadina (IgG-AGA), rilevati però soltanto nella metà dei pazienti (Lebwohl et al., 2015).

5 - L'ALLERGIA AL FRUMENTO

La *wheat allergy* (WA), l'allergia al frumento, è una delle possibili reazioni avverse provocata dall'assunzione di frumento. Si tratta di una classica forma allergica che si presenta con manifestazioni cutanee, sintomi gastrointestinali e/o respiratori. Sintomi tipici sono l'anafilassi indotta da esercizio frumento dipendente (*wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis - WDEIA*), l'asma del panificatore (*baker's asthma*), la rinite e l'urticaria da contatto (Sapone et al., 2012).

5.1 - DIFFUSIONE

Uno studio svedese (Sapone et al., 2012) che ha coinvolto 2336 bambini riporta che all'età di 4 anni la prevalenza dei partecipanti che presentavano sensibilizzazione al frumento era del 4%. Negli Stati Uniti la *US Food and Drug Administration* riporta un'indagine che indica che la prevalenza di casi autodiagnosticati e successivamente confermati da diagnosi medica era dello 0,4% (Sapone et al., 2012).

Una *review* di Zuidmeer et al. (Sapone et al., 2012) riporta i dati di due studi condotti in Germania e in Gran Bretagna. Nell'ambito dello studio è stato eseguito un *challenge test* con frumento, la prevalenza individuata era in questo caso dello 0,5%.

5.2 - MANIFESTAZIONI CLINICHE

Le presentazioni cliniche possono essere distinte in quelle caratterizzate da manifestazioni che coinvolgono l'apparato respiratorio, dovute ad inalazione, e manifestazioni che sono dovute all'ingestione di alimenti contenenti l'allergene (Sapone et al., 2012) (Figura 15). Tra le manifestazioni a livello dell'apparato respiratorio ci sono l'asma del panificatore e la rinite, note sin dai tempi degli antichi romani, sono risposte allergiche dovute all'inalazione di farina e polveri di frumento. Si tratta di un disturbo molto diffuso. Uno studio polacco (Sapone et al., 2012) riporta che il 4,2% degli apprendisti panettieri presentava le classiche complicazioni respiratorie tipiche dopo soltanto un anno, dopo due anni la percentuale di

coloro che presentavano sintomi saliva all'8,6% (Sapone et al., 2012). Le manifestazioni allergiche dovute a ingestione di frumento possono essere distinte in due categorie. La prima è una sindrome ben definita, ovvero l'anafilassi indotta da esercizio frumento dipendente, ed è causata dalla componente del glutine delle gliadine ω-5. La seconda tipologia di risposta allergica, che include dermatite, urticaria, anafilassi è determinata da un range più ampio di proteine del frumento (Sapone et al., 2012).

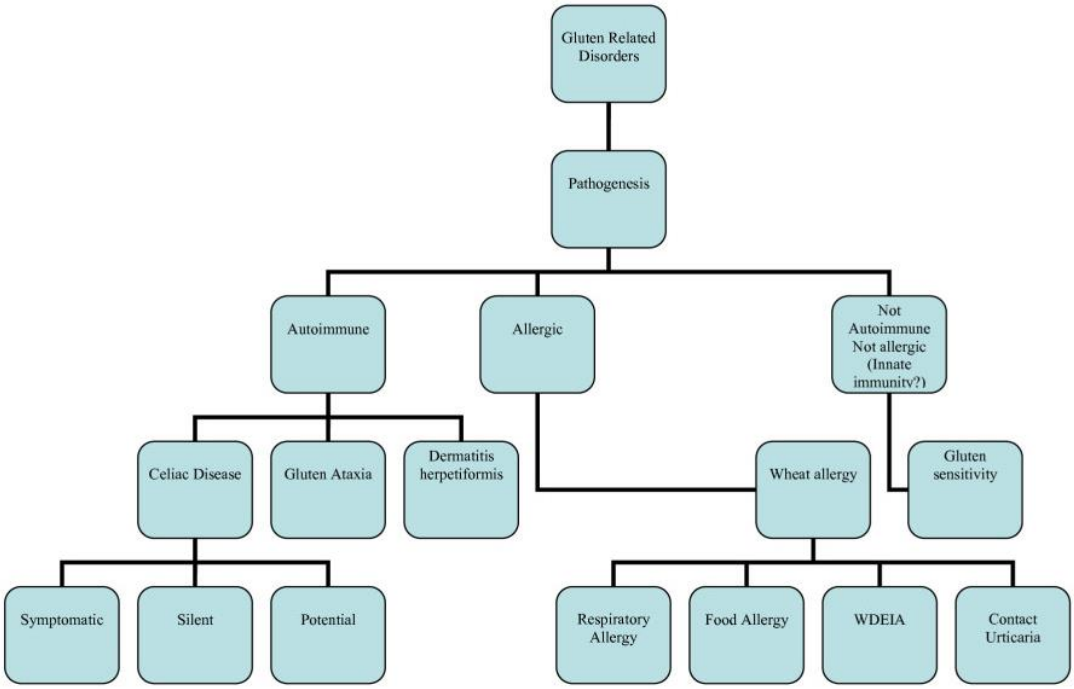

Figura 15 Classificazione dei disturbi glutine correlati

(Sapone et a., Spectrum of gluten-related disorders: consensus of new nomenclature and classification, 2012)

6 - LA QUESTIONE “FRUMENTI ANTICHI E MODERNI”. EVIDENZE SCIENTIFICHE RIGUARDO LE DIFFERENZE TRA FRUMENTI ANTICHI E MODERNI

L’attenzione volta alle allergie e alle intolleranze alimentari negli ultimi anni è stata crescente, anche a causa della loro sempre maggiore diffusione.

Uno dei fattori coinvolti nella patogenesi della celiachia e nelle altre intolleranze glutine correlate è rappresentato dalle gliadine, le quali, insieme alle glutenine danno il glutine, e sono una componente proteica di alcune specie vegetali appartenenti alla famiglia delle Poacee.

Negli ultimi anni si è diffuso il sospetto che la selezione e la recente evoluzione genetica del frumento siano coinvolte nella crescita esponenziale dei casi di intolleranza collegati al glutine. In primis, parlando di queste intolleranze, indubbiamente si pensa e si parla di celiachia, dato questa è l’intolleranza alimentare più diffusa al mondo. Questo dibattito purtroppo non sempre si basa argomentazioni aventi valore scientifico (Figura 16). A facilitare la diffusione di queste informazioni ovviamente contribuisce internet e al consumatore che presta poca attenzione alle fonti può facilmente arrivare un quadro completamente distorto della situazione.

Figura 136 La discussione riguardo alle varietà antiche e moderne di frumento spesso si avvale di argomentazioni prive di valore scientifico (https://www.slideshare.net/rinonotaro/5-i-pericoli-del-glutine-nel-grano-moderno)

La comunità scientifica si è occupata, e si sta occupando, ampiamente dell'argomento, andando ad analizzare le proteine del frumento e degli altri cereali contenti prolamine che scatenano reazioni avverse. La prolamina del frumento, ovvero la gliadina, è stata sicuramente la più studiata. L'ovvia motivazione sta nel fatto che il frumento è il cereale più diffuso e consumato al mondo.

Sono state confrontate varietà antiche e moderne sia di frumento tenero che di frumento duro. Riguardo a cosa possa essere considerato antico e cosa invece possa essere considerato moderno è necessario spendere qualche riga. Non c'è infatti una chiara concordanza su quali debbano essere considerate varietà antiche, dato che, come visto nel capitolo dedicato all'evoluzione del frumento, la storia di questo cereale inizia tantissimo tempo fa. Come linea di demarcazione vengono spesso usati, e anche qui ripresi, gli anni della Seconda guerra mondiale. Le varietà antiche saranno quindi quelle diffuse e coltivate maggiormente negli anni antecedenti al 1939, le varietà considerate moderne saranno invece quelle diffusesi successivamente.

Le diverse cultivar (*cultivated variety*, termine che corrisponde al concetto di varietà coltivata) sono state messe a confronto in diversi studi scientifici, prendendo in considerazione:

- La quantità totale di proteine
- La quantità di glutine
- La tipologia di glutine
- La forza del glutine
- Quali peptidi vengono generati dalla digestione enzimatica

Oltre al confronto riguardo ai punti elencati sopra sono stati presi in considerazione anche altri aspetti, come la modificazione della quantità di glutine assunta con l'alimentazione e la differenza, in termini di componenti bioattive, contenute nelle varietà di frumento antiche e moderne.

6.1 - GLIADINE, GLUTENINE E LA MAGLIA DEL GLUTINE

Le proteine del glutine, che rappresentano circa l'80% delle proteine di riserva della cariosside del frumento, sono composte, circa in uguale quantità, da gliadine e glutenine.

Le gliadine sono delle proteine globulari e contengono la maggior parte dei residui di cisteina, i quali permettono la formazione ponti disolfuro, importanti, come verrà illustrato in seguito, per la formazione della maglia tridimensionale del glutine.

Le glutenine sono costituite da catene, originano delle fibre, le quali formano una rete, in questa rete si andranno a collocare le gliadine.

Gliadine e glutenine possono essere suddivise in base alla loro mobilità elettroforetica (de Santis et al., 2017).

Le gliadine, monomeriche, possono essere suddivise in gruppi che vengono indicati, rispettivamente, dalle lettere: α, β, γ, ω. Queste possono essere ulteriormente suddivise in due gruppi, in quanto le ω-gliadine si differenziano dalle α, β e γ perché sono le uniche ad essere povere di zolfo, ovvero non contengono residui di cisteina.

Le glutenine, polimeriche, vengono invece distinte in glutenine ad alto peso molecolare (*High Molecular Weight Glutenin Subunits* – HMW-GS) e glutenine a basso peso molecolare (*Low Molecular Weight Glutenin Subunits* – LMW-GS) (Figura 17). Le glutenine HMW-GS possono essere ulteriormente suddivise in tipologia "x" ed "y" (x- e y-*type*). Nel caso dei frumenti tetraploidi, che non hanno il genoma D, le glutenine sono codificate da geni collocati sui bracci lunghi dei cromosomi 1A e 1B, ai loci *Glu-A1* e *Glu-A2*. Le glutenine LMW-GS, invece, possono essere ulteriormente suddivise in tipo B-, C- e D- in base alle loro proprietà strutturali e funzionali. Anche in questo caso, come visto precedentemente per le gliadine, l'ulteriore suddivisione può essere fatta in funzione della presenza o dell'assenza di residui di cisteina. Le glutenine a basso peso molecolare di tipo B e C sono ricche di zolfo, mentre le glutenine a basso peso molecolare di tipo D sono povere di zolfo.

Le glutenine si possono distinguere anche in base al primo amminoacido della proteina matura nelle sottocategorie "s", "m" ed "i". Le lettere indicano, rispettivamente, gli amminoacidi serina, metionina ed isoleucina. I geni che codificano queste proteine sono collocati sul cromosoma 1 (1A e 1B) ai loci *Glu-A3* e *Glu-B3*. Le glutenine LMW-GS di tipo B- sono codificate da geni collocati sul cromosoma 1, mentre quelle di tipo C- e D- sono codificate da geni situati su cromosomi del gruppo 6.

Le gliadine di tipo γ sono codificate da geni situati sul cromosoma 1, ai loci *Gli-1*. Le gliadine delle subunità α- e β- sono invece codificate da geni dei loci *Glu-2* situati sul braccio

corto del gruppo cromosomico 6. Nel frumento duro le ω gliadine sono codificate da geni del cromosoma 1 (1A e 1B). Le ω gliadine vengono distinte anche in base alla loro sequenza N terminale in ω-1 e ω-5 (de Santis et al., 2017).

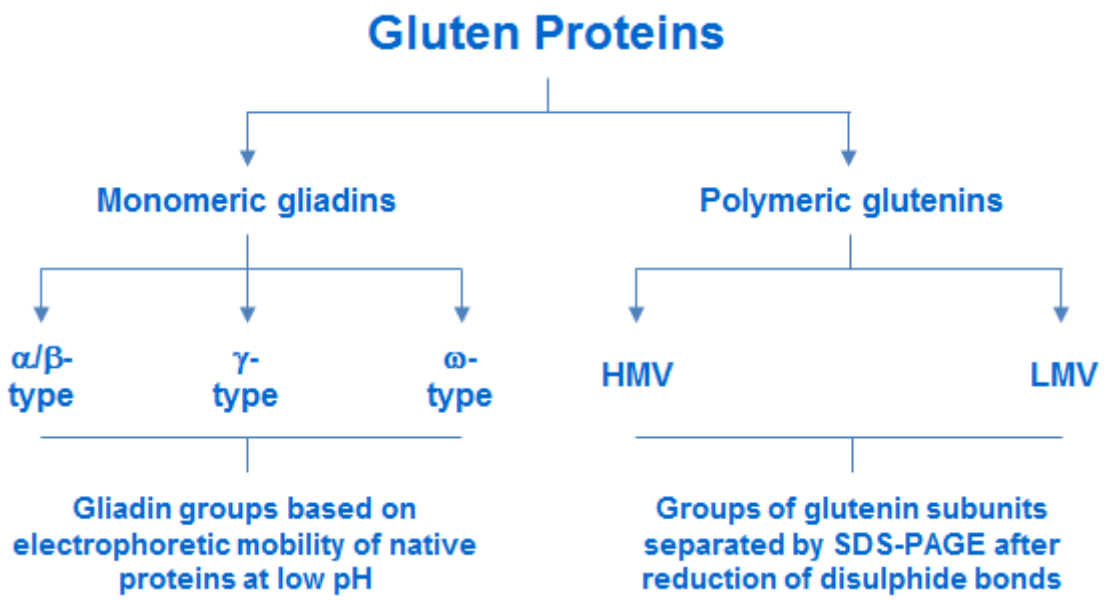

Figura 17 Tipologie di gliadine e glutenine (http://www.phadia.com/da/Products/Allergy-testing-products/ImmunoCAP-Allergen-Information/Food-of-Plant-Origin/Allergen-Components/nGliadin-Wheat/)

Le proteine del glutine differiscono per la loro solubilità:

- le gliadine sono solubili in acqua, in presenza di alcol al 70%
- le glutenine sono solubili in soluzioni acide o alcaline, di queste le HMW-GS sono le più insolubili

Gli amminoacidi più rappresentati nelle gliadine e nelle glutenine sono la glutammina e la prolina. Un altro amminoacido presente, anche se non il più abbondante, è la cisteina, la quale è importante perché possano formarsi, nella maglia del glutine, ponti disolfuro.

La maglia del glutine è costituita dalle proteine, acqua (Figura 18) e una piccola componente lipidica che sono associati tra loro tramite interazioni intramolecolari e intermolecolari. Sono soprattutto le seconde, quelle intermolecolari, ad essere importanti.

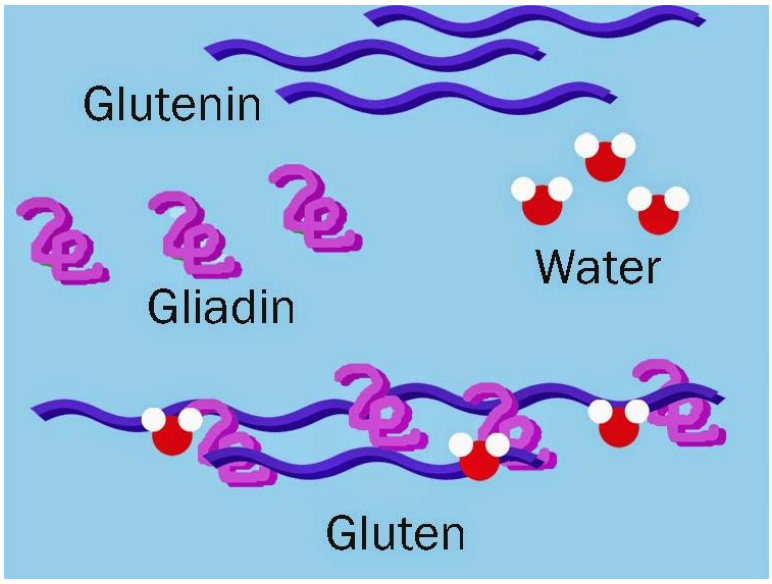

Figura 18 La maglia del glutine

La componente lipidica, seppur piccola, è importante perché i lipidi coinvolti sono polari. Questi lipidi, soprattutto glicolipidi e fosfolipidi, partecipano alla formazione di interazioni tra i costituenti del glutine.

I legami tra i vari componenti sono sia di natura covalente che non covalente e sono: legami idrogeno, ponti disolfuro, legami ionici, interazioni idrofobiche tra componenti non polari.

Le caratteristiche del glutine dipendono sia dalle caratteristiche dei singoli componenti, come anche dai rapporti e dalle proporzioni tra essi.

Le gliadine sono la componente che, quando si forma il glutine, conferisce estensibilità e viscosità, mentre le glutenine conferiscono elasticità e tenacità.

Nel caso di una materia prima, come una farina di frumento tenero, particolarmente ricca di gliadine l'impasto che ne risulterà sarà un impasto che assorbe molta acqua, che avrà bisogno di un maggior tempo di lievitazione e il cui volume finale sarà particolarmente elevato. Nel caso di una farina meno ricca di gliadine si avrà la situazione opposta, ovvero per la formazione dell'impasto sarà necessaria meno acqua, il tempo di lievitazione necessario sarà inferiore e l'impasto avrà un volume minore.

6.2 - LA QUANTITÀ TOTALE DI PROTEINE

Kasarda (2013) tratta, tra i vari aspetti, anche quello del contenuto totale di proteine, confrontando varietà antiche e moderne.

Nell'articolo il confronto riguarda varietà di frumento duro, in quanto una delle caratteristiche fondamentali di questa tipologia di frumento è proprio il contenuto in proteine. L'elevato contenuto in proteine conferisce al frumento duro le caratteristiche che lo rendono adatto per le trasformazioni tecnologiche alle quali è destinato, ovvero la produzione di pane e soprattutto di pasta. Nel caso del frumento tenero, invece, è auspicabile un contenuto proteico inferiore. Il frumento tenero infatti viene prevalentemente usato per la produzione di prodotti da forno, come il pane e i dolci. Nel caso dei prodotti da forno si tratta di prodotti dove conta più, rispetto a un tenore proteico elevato, la presenza di quantità sufficientemente elevate di amido. Il range ottimale, per quanto riguarda la quantità di proteine, è tra il 12 e il 14% nel caso del frumento duro e tra il 7 e l'11% per il frumento tenero.

Ovviamente il tenore proteico è stata una delle principali caratteristiche in base alle quali è stata fatta la selezione dei frumenti.

I dati riportati da Kasarda (2013) riguardano colture di frumento tenero allevate negli Stati Uniti a partire dalla prima metà del 1900 fino al 2011.

In Kansas, per esempio, i dati riportano che nella maggior parte degli anni, dal 1949 al 2011, la percentuale proteica ricadeva nel range tra 11 e 13%. L'eccezione è rappresentata da due anni in cui questo andamento non venne rispettato: nel 1956 la percentuale era di 14.1%, quindi più alta rispetto al range atteso, mentre nel 1961 la percentuale fu più bassa dell'11%, ovvero si attestò al 10,7%. Sempre in relazione a colture coltivate in Kansas, in un periodo antecedente, ovvero nella prima metà del 1900, Kasarda (2013) si riferisce in modo generico ad alcuni articoli secondo i quali il range era tra 8,77 e 14,26%. Questi dati si riferiscono sempre a colture a semina autunnale.

Kasarda (2013) riporta che è stato verificato un tenore proteico più elevato nelle colture a semina primaverile condotte nelle pianure settentrionali degli Stati Uniti, rispetto a quelle a semina autunnale nello stesso ambiente. In media la differenza è di 2 punti percentuali. Il range atteso, in queste condizioni, sarà tra il 12 e il 16%. I fattori che determinano un

contenuto proteico maggiore sono sia di natura genetica, sia di natura ambientale. Sempre per quanto riguarda il Kansas analizzando i dati della prima parte del XX secolo è stato possibile individuare ulteriori scostamenti rispetto alle percentuali attese. Ad esempio, sul finire degli anni ’20 la percentuale di proteine era relativamente bassa, intorno al 13%. La causa di ciò, molto probabilmente, furono delle precipitazioni particolarmente intense. La percentuale salì, e fu particolarmente elevata, negli anni ’30. In questo periodo, secondo Kasarda (2013), il tenore proteico si aggirava intorno al 15%. Anche in questo caso, con grande probabilità, il fattore determinante furono le condizioni climatiche.

A parte fluttuazioni occasionali, determinate da condizioni straordinarie, secondo Kasarda (2013) si può sostenere che la media del contenuto proteico del frumento tenero ha subito limitate variazioni nel corso del 1900. Non è stata evidenziata, sotto questo punto di vista, una differenza tra frumenti antichi e moderni. Kasarda (2013) sottolinea, inoltre, che solitamente per la produzione industriale vengono impiegate miscele di farine, per mantenere stabili le caratteristiche tecnologiche e permettere quindi una uniformità organolettica del prodotto finale. In altre parole, oltre a non esserci stata una significativa variazione del contenuto proteico, tale contenuto viene mantenuto stabile “artificialmente”, ovvero mediante interventi tecnologici.

De Santis et al. (2017) hanno comparato otto varietà moderne e sette varietà antiche di frumento duro. Le varietà prese in esame sono state coltivate in campo a Foggia in due annate agrarie successive, quella del 2012-13 e quella del 2013-14. L’articolo verrà trattato in modo più approfondito in un paragrafo successivo, dato che si è occupato principalmente del differente contenuto in gliadine tra le diverse varietà. C’è però anche un accenno al contenuto proteico totale, il quale è risultato essere maggiore nelle varietà antiche nella prima stagione dello studio (2012-2013), mentre non presentava significative differenze nella seconda stagione (2013-2014).

6.3 - L’EPITOPO GLIA-α9

Dalla digestione delle proteine del glutine risultano dei frammenti amminoacidici, degli epitopi. Alcuni di questi epitopi producono una reazione avversa nella maggior parte dei pazienti celiaci in quanto vanno a stimolare le cellule T. Tra gli epitopi considerati più tossici per i celiaci ci sono quelli derivati dalle α-gliadine. Uno di questi è Glia-α9, il quale viene

definito immunodominante, ovvero viene riconosciuto dalle cellule T (van den Broeck et al., 2010). In questo studio sono presi in considerazione gli epitopi generati dalla digestione del glutine.

Lo studio ha riguardato 36 varietà moderne e 50 varietà antiche di frumento tenero. Sono stati ricercati l'epitopo Glia-α9, il quale, come accennato precedentemente, viene riconosciuto come tossico nella maggior parte dei pazienti celiaci, e un altro epitopo minore, il Glia-α20, incluso per avere un riferimento tecnico. Glia-α20 genera reazioni avverse in una quantità molto ridotta di celiaci.

Nella maggior parte delle varietà moderne c'è un elevato contenuto di Glia-α9, e questo potrebbe far pensare al fatto che, effettivamente, i frumenti moderni abbiano contribuito all'incremento dei casi di celiachia.

Altre varietà, sia antiche che moderne, hanno invece un contenuto basso dell'epitopo Glia-α9, il che offre uno spunto interessante per poter cominciare a pensare e a sviluppare varietà di frumento che abbiano un basso contenuto di epitopi riconosciuti come tossici per le persone predisposte alla celiachia.

Van den Broeck et al. (2010) hanno usato degli anticorpi monoclonali (*Monoclonal Antibodies* – Mab), specifici per gli epitopi Glia-α9 e Glia-α20.

Per poter rilevare quali epitopi fossero presenti sono state estratte la quasi totalità di glutenine e gliadine dei frumenti mediante tre successive estrazioni. Le proteine in seguito sono state separate tramite SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil solfato; tecnica analitica che permette l'analisi di estratti proteici). Essendo numerose le varietà da comparare molte l'unico metodo utilizzabile era la colorazione monoclonale Ab.

I risultati dello studio indicano che il contenuto di glutine delle varietà moderne era inferiore rispetto a quello delle varietà antiche. Nella farina ottenuta dalle varietà moderne il contenuto in glutine era, in media, 24.4 ± 3.6 μg/mg di farina. Nelle varietà antiche il contenuto era, sempre in media, di 30.9 ± 3.4 μg/mg di farina. Il differente quantitativo di glutine è, con molta probabilità, riconducibile alle diverse condizioni ambientali in cui i frumenti sono cresciuti.

Nella maggior parte delle varietà moderne sono stati ottenuti pattern di colorazione simili, eccetto che per le varietà Kornett, Bovictus, Trakos, Toronto, Tambor, Bold, Dakota, Cadenza.

Usando gli anticorpi monoclonali Glia-α20 sono state colorate due proteine linkate l'una all'altra, appartenenti alle ω-gliadine/D-type LMW-GS, a cui è stato assegnato il nome "blocco 1". La massa molecolare del blocco 1 era di ~55 kDa. Il blocco 1 era presente in 26 delle varietà moderne analizzate. Le restanti 10, invece, presentavano un blocco dal peso molecolare di ~60 kDa, il quale poteva essere colorato anche con gli anticorpi monoclonali Glia-α9.

Le ω-gliadine sono codificate da due geni strettamente associati sul locus *Gli*-D1. Sperimentalmente è stato dimostrato che, rimuovendo parti del braccio corto del cromosoma 1D, le proteine correlate a questi geni risultano assenti. Non sono state rimosse invece ω-gliadine reagenti con gli anticorpi monoclonali Glia-α20 e Glia-α9 andando a rimuovere parti sui bracci corti 1A e 1B. Van den Broeck et al. (2010) concludono che i loro risultati supportano teorie già avanzate precedentemente, le quali ipotizzano un coinvolgimento delle ω-gliadine e dei loro epitopi con la celiachia.

In alcune varietà, tra cui Bovictus, Toronto e Dakota è stato rilevato, tramite la colorazione con anticorpi monoclonali Glia-α20, un altro blocco definito, nell'ambito dello studio di van den Broeck et al. (2010), "blocco 2". Il peso molecolare di queste proteine linkate tra loro era tra i 42 e 50 kDa e veniva colorato anch'esso con gli anticorpi monoclonali Glia-α9. I dati quindi indicano che queste proteine contengono entrambi gli epitopi.

Le proteine del blocco 1 e del blocco 2 sono presenti le une indipendentemente dalle altre e non sono presenti in frumenti tetraploidi. Questo suggerisce che sono, con molta probabilità, codificate da geni collocati sul cromosoma 1D.

La maggior parte delle α gliadine contiene l'epitopo Glia-α9, mentre soltanto in pochi casi è presente l'epitopo Glia-α20.

I risultati riguardanti le varietà antiche mostrano una maggiore variabilità per quanto riguarda il pattern proteico legante gli anticorpi monoclonali Glia-α20 e Glia-α9.

Per quanto riguarda i due blocchi di cui si parla nello studio, denominati rispettivamente blocco 1 e blocco 2, entrambi presenti nelle varietà moderne, soltanto il blocco 1 era presente nelle varietà antiche prese in esame.

Van den Broeck et al. (2010) hanno studiato gli *immunoblot* (procedura di individuazione di antigeni presenti su membrana (*blot*) grazie al legame con anticorpi) risultanti dall'analisi delle varietà antiche e moderne, dividendo i risultati in tre gruppi in base all'intensità della colorazione. I tre gruppi sono "intensità bassa", "intensità media", intensità elevata".

Tra le varietà moderne Cadenza ha mostrato la minore risposta ad entrambe le tipologie di anticorpi monoclonali. Tra le varietà antiche, invece, la risposta minore è stata quella di CGN08327. Una bassa risposta agli anticorpi monoclonali Glia-α9 e una risposta media a quelli Glia-α20 è stata quella delle varietà antiche Minaret, Weissahr Rotkorn Binkel, Rouge de la Gruyere, CGN12071 e Pyrothirix 28.

Van den Broeck et al. (2010) suggeriscono che, effettivamente, le varietà moderne hanno un contenuto più elevato dell'epitopo immunodominante Glia-α9, il quale va a stimolare le cellule T (Figura 19).

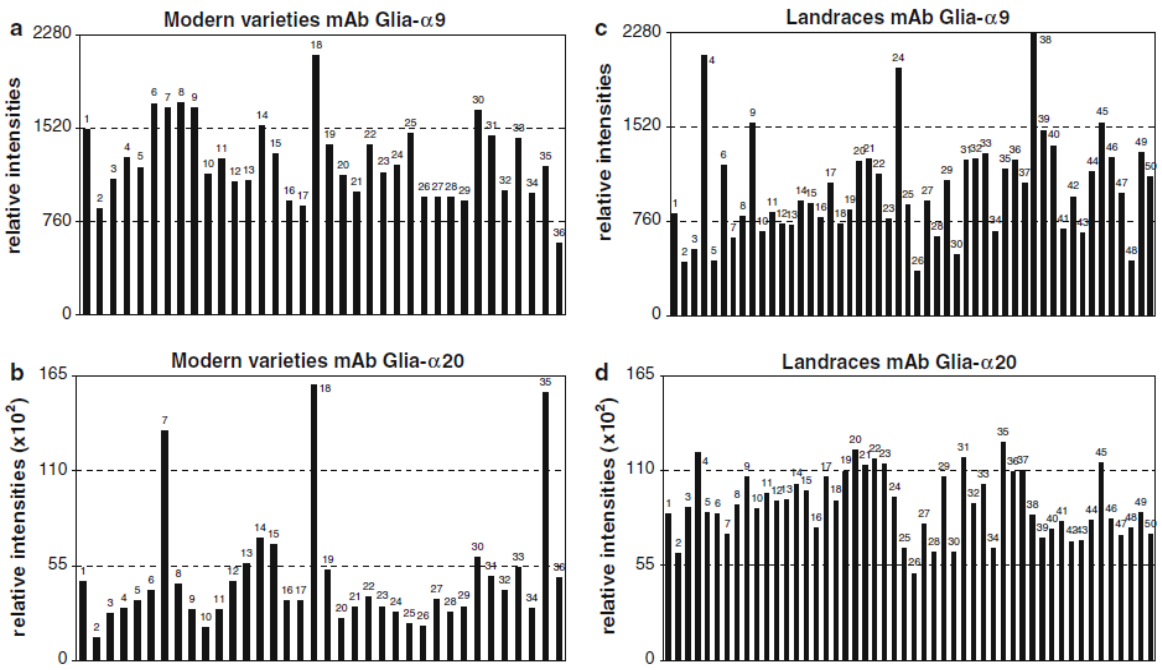

Figura 19 L'epitopo glia- è maggiormente rappresentato nelle varietà moderne prese in esame (Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease, van den Broeck et al., 2010)

Van den Broeck et al. (2010) prendono in considerazione anche altri punti, che verranno qui trattati in altri paragrafi, ovvero la riduzione della biodiversità, il maggiore consumo di

determinate tipologie di frumento e di prodotti trasformati a cui spesso viene aggiunto del glutine, nonostante si tratti di un prodotto all'interno del quale il consumatore non si aspetterebbe di trovare questo ingrediente.

Van den Broeck et al. (2010), concludendo, suggeriscono che uno degli aspetti più interessanti, una volta individuate le componenti genetiche correlate alle caratteristiche che predispongono alla celiachia, sarebbe lo sviluppo di varietà che hanno un basso contenuto in epitopi tossici.

6.4 - STUDI COMPARATIVI TRA FRUMENTI ANTICHI E MODERNI

Nell'articolo già precedentemente citato de Santis et al. (2017) hanno studiato quali potrebbero essere stati gli effetti dei frumenti moderni, e della loro composizione, sulla salute dei consumatori. Attualmente sono 31 gli epitopi coinvolti nelle reazioni avverse quando assunti da persone predisposte alla celiachia (de Santis et al., 2017). Insieme alla celiachia, tra le maggiori problematiche immunomediate, c'è l'allergia al frumento. Ad elicitare la risposta avversa in questo caso ci sono le albumine, le globuline e le prolamine. Le gliadine ω-5 sono riconosciute, tra gli allergeni dei frumenti, tra quelli che provocano anafilassi indotta da esercizio fisico. Lo scopo dello studio era di andare ad indagare le modificazioni nella composizione delle proteine del glutine e della loro qualità. Lo studio si è protratto per due anni e si è concentrato su sette varietà antiche e otto varietà moderne di frumento duro, cresciute in campo (de Santis et al., 2017).

Le varietà di frumento duro antiche considerate da de Santis e colleghi (2017) erano:

- Dauno (1900)
- Saragolla antico (1900)
- Russello (1910)
- Timilia (1910)
- Cappelli (1915)
- Garigliano (1927)
- Grifoni 235 (1949)

Le varietà di frumento duro moderne considerate da de Santis e colleghi (2017) erano:

- Adamello (1985)

- Simeto (1988)
- Preco (1995)
- Iride (1996)
- Svevo (1996)
- Claudio (1998)
- Saragolla (Iride x PSB 014 *line*) (2004)
- PR22D89 (2005)

Le date accanto ai nomi delle varietà si riferiscono all'anno di costituzione di ciascuna.

La composizione delle proteine del glutine è stata determinata con la SDS-PAGE e si è concentrata sulle differenti composizioni, con particolare attenzione all'espressione delle ω gliadine.

De Santis e colleghi (2017) si riferiscono a varietà antiche parlando di cultivar distribuite tra il 1900 e il 1949, mentre le cultivar moderne sono state distribuite a partire dal 1985 e sono portatrici dei geni *Rht* (*reduced height*, ovvero di bassa taglia).

Le varietà di frumento prese in esame sono state coltivate a Foggia, nelle due stagioni agrarie consecutive 2012-13 e 2013-14. I semi provenivano dal CER-CREA (Centro di Ricerca per la Cerealicoltura del Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria). Le colture sono state concimate usando azoto, in quantità che rispettavano i normali standard di concimazione delle regioni mediterranee, di cui 1/3 è stato distribuito alla semina (150 kg ha^{-1} di fosfato di ammonio N 18%, P 46%) e 2/3 sono stati distribuiti durante la fase di accrescimento (200 kg ha^{-1} di nitrato di ammonio N 26-27%). Per quanto riguarda le precipitazioni, non sono state evidenziate differenze significative tra le due stagioni.

Le proteine dell'endosperma sono state estratte e successivamente le gliadine sono state separate dalle glutenine tramite l'SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis,* una elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di Sodio dodici solfato). Per la colorazione è stato usato il blu brillante di Coomassie, per la determinazione del peso molecolare delle proteine è stato utilizzato un marker e l'intensità di banda è stato determinato come volume totale e relativo. Le gliadine sono state suddivise in due gruppi, il gruppo ω- e il gruppo γ-/α-, dato che le bande γ- e α- sono soggette a una parziale sovrapposizione. Le glutenine, invece, sono state suddivise in HMW-GS e LMW-GS.

Su cinque varietà antiche e quattro varietà moderne è stata effettuata un'analisi Western blot (tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici) basata sul polimorfismo delle ω-gliadine. È stato utilizzato un anticorpo monoclonale primario (Ab) contro la sequenza N terminale delle ω-gliadine. Successivamente è stata determinata l'espressione delle gliadine ω-5 in rapporto al totale delle ω-gliadine. Sulla base dei risultati le gliadine di due varietà, una antica e una moderna, ovvero Dauno III e Saragolla (Iride x PSB 014 *line*), sono state analizzate tramite la SDS-PAGE bidimensionale.

La resa delle varietà moderne è stata, come atteso, superiore rispetto a quello delle varietà antiche. Tra le varietà antiche la resa maggiore è stato quello di Grifoni 235.

Nella stagione agraria 2012-13 le rese maggiori sono state quelle di Garigliano, Cappelli, Grifoni 235. Nella stessa stagione, tra le varietà moderne, la resa migliore è stata quella di PR22D89. Le rese più basse sono state invece, tra le varietà antiche, quelle di Timilia, tra quelle moderne quelle di Saragolla.

Nella stagione agraria 2013-14 le rese maggiori tra i frumenti antichi sono state quelle di Garigliano, mentre, sempre tra le varietà antiche, la resa inferiore è stata quella di Timilia. Tra i grani moderni invece la resa migliore nel 2013-14 è stata quella di Saragolla, il quale aveva avuto la resa minore nell'annata precedente. Preco invece, ha avuto la resa più bassa.

La maggiore variabilità, in termini di resa considerando entrambe le stagioni, per le varietà moderne è stata quella di: Claudio, Iride, Saragolla e PR22D89. Questa differenza nella resa non ha riguardato invece le varietà antiche.

Per quanto riguarda il contenuto in gliadine e glutenine, e il loro rapporto, questo valore era inferiore nei grani moderni, sia nella prima che nella seconda stagione. Tra le gliadine le più rappresentate, in tutte le varietà, erano le α- e le β-. Tra le glutenine invece erano più rappresentate, nell'ordine, le LMW-GS di tipo B-, seguite dalle HMW-GS e infine c'erano le LMW-GS di tipo C-.

Riguardo alle ω-gliadine, analizzate mediante SDS-PAGE, è stata verificata una differenza tra i genotipi sia per quanto riguarda il numero di bande, sia per quanto riguarda la loro mobilità nella regione 50-70 kDa, il che indica la presenza di diverse forme alleliche per questa tipologia di gliadine.

La proporzione maggiore delle ω-gliadine è stata trovata nelle varietà antiche, soprattutto in Dauno III e Saragolla, con le seguenti percentuali:

- Timilia, 2013 – 18.2%, 2014 – 17.1%
- Dauno III, 2013 – 14.1%, 2014 – 11.2%

Facendo un confronto tra il contenuto di ω-gliadine di tutte le varietà è risultata una chiara differenza genetica tra le varietà antiche e quelle moderne. L'espressione è risultata inferiore, di circa tre volte, nel gruppo dei frumenti moderni (4% contro l'11%).

Usando il Western blot e un anticorpo monoclonale ω-5 sono state analizzate cinque varietà moderne e quattro varietà antiche, sulla base del polimorfismo delle ω-gliadine. La proporzione delle bande di gliadina ω-5 sul totale delle gliadine di tipo ω era del 75% circa, compresa in un range tra il 50 e l'80%. La proporzione è risultata essere più elevata nel 2013, ma non sono state rilevate delle differenze sostanziali tra le varietà antiche e moderne prese in esame.

Dauno III, quindi una delle varietà antiche, e Saragolla, una delle varietà moderne, sono state prese in esame in modo più approfondito con la SDS-PAGE bidimensionale. Da questa analisi è risultata una differenza tra il numero e la posizione degli *spots* delle ω-gliadine delle due varietà. Dauno III presentava, infatti, 5 *spots* nella regione del gel corrispondente a 55-58kDa, e altri 6 *spots* nella regione 48-50kDa. Saragolla invece presentava solo 3 *spots* nella regione 60kDa.

Per quanto riguarda il valore medio di α- e le γ- gliadine non sono state rilevate differenze sostanziale tra le diverse varietà. La relativa proporzione, invece, tra tipo α- e γ-, normalizzato per unità di proteine della semola, risultava essere maggiore nel gruppo delle varietà antiche.

Le varietà antiche hanno mostrato una proporzione marcatamente più elevata di ω-gliadine. Secondo i dati dello studio di de Santis et al. (2017), che concordano anche con altre fonti (Hurkman et al., 2013; Giuliani et al., 2015), il contenuto di ω-gliadine è influenzato dalla quantità di precipitazioni. Quando le colture sono sottoposte a stress idrico, come si è verificato nella stagione 2012-2013 nell'ambito della ricerca di de Santis et al. (2017), sembra che la quantità di ω-gliadine aumenti.

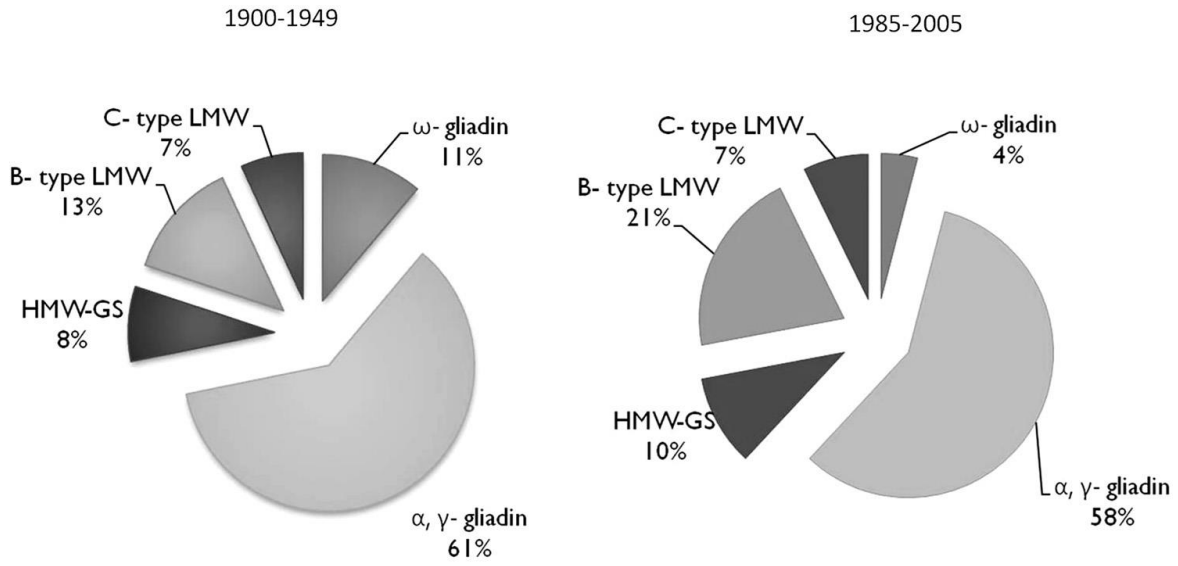

Figura 20 Composizione proteine di riserva in varietà antiche e moderne (Differences in gluten protein composition between old and modern durum wheat genotypes in relation to 20th century breeding in Italy - De Santis et al., 2017)

Le gliadine α- e γ- contengono numerosi epitopi relazionati alla celiachia. Sempre per quanto hanno potuto rilevare de Santis et al. (2017), sembra che non ci siano differenze significative nel loro contenuto relazionate alle varietà antiche e moderne (Figura 20). Queste affermazioni sono sostenute anche da un altro studio molto recente di Ribeiro et al. (2016).

Uno studio simile è stato condotto da Prandi et al. (2016). Lo studio ha preso in esame varietà antiche e moderne, confrontandole dopo aver effettuato una digestione gastrointestinale simulata in vitro. Sono stati poi confrontati i peptidi generati da questa digestione, con particolare attenzione a quelle sequenze che sono già note per essere coinvolte nella celiachia.

Le specie prese in esame in questo caso sono:

- *Triticum aestivum*; varietà grano del miracolo e Virgilio (varietà antiche), varietà Blasco e Bologna (varietà moderne)
- *Triticum turgidum* ssp. *durum*; varietà Timilia e Senatore Cappelli (varietà antiche), varietà Odisseo (varietà moderna)
- *Triticum monococcum* L; varietà ID331 (varietà moderna)
- *Triticum dicoccum* L.; varietà farro della Garfagnana (varietà antica),
- *Triticum spelta* L.; varietà Rouquin (varietà moderna)

Le specie sono state coltivate in due zone differenti, Parma e Bologna.

Gli autori dell'articolo specificano che per "varietà antica" intendono varietà costituite prima della Seconda Guerra mondiale, mentre per "varietà moderne" intendono varietà costituite dopo la Seconda Guerra mondiale.

Il contenuto in proteine delle diverse varietà prese in esame va dal contenuto minimo del frumento tenero Blasco (11,2%) al contenuto massimo del tritico monococco ID331 (17,3%).

I contenuti proteici sono stati rilevati tramite il metodo Kjeldahl (metodo analitico che permette di determinare il contenuto di azoto di sostanze organiche e inorganiche).

Le cariossidi sono state macinate e sottoposte a una digestione simulata, in vitro. I peptidi venutisi a formare sono stati analizzati tramite cromatografia liquida, in questo caso più adatta in quanto si andava ad analizzare molecole aventi un peso molecolare elevato, accoppiata a spettrometria di massa (UPLC/ESI-MS: cromatografia liquida ultraperformante accoppiata a spettrofotometria di massa).

I peptidi sono stati identificati tramite spettrometria di massa a stadi multipli. Per quanto riguarda il confronto di questi peptidi, relazionati alla tipologia di varietà, antica o moderna, è stata eseguita una analisi discriminante. I peptidi presi in esame erano 9, tra cui uno contenente una sequenza immunogenica e due peptidi contenenti sequenze tossiche. Una delle due sequenze tossiche è risultata essere presente in quantità particolarmente elevate nelle varietà antiche.

I peptidi immunotossici sono stati quantificati nelle diverse varietà. L'identificazione è stata fatta tramite spettrometria di massa a bassa risoluzione. Sono stati prese in esame due tipologie di peptidi, identificati precedentemente da altri studi scientifici:

- Immunogenici, ovvero quelli che determinano una risposta adattativa da parte del sistema immunitario
- Tossici, ovvero quelli che stimola la risposta immune innata

Nessuna delle varietà analizzate è risultata essere "sicura" per chi è affetto da celiachia, in quanto in tutte sono contenuti epitopi immunotossici.

I peptidi immunogenici derivano dalle γ-gliadine, mente quelli tossici derivano dalle α-gliadine, γ-gliadine e dalle glutenine LMW-GS.

Non sono state osservate differenze, per quanto riguarda il contenuto proteico e nemmeno per quanto riguarda il contenuto in peptidi immunotossici, tra varietà coltivate con metodi di agricoltura convenzionale e metodi di agricoltura biologica.

Per quanto riguarda i peptidi immunogenici il contenuto maggiore è stato quello registrato nel frumento comune, ovvero il frumento tenero. Il contenuto medio era di 524 mg/kg, da un minimo di 240 mg/kg di Blasco fino a un massimo di 829 mg/kg di grano del miracolo. Di poco inferiori sono le quantità registrate nelle specie tetraplodi, ovvero farro medio o dicocco e nel frumento duro. In media il contenuto di questi peptidi era, per il frumento duro, di 457 mg/kg, con contenuto minimo registrato nell'Odisseo (208 mg/kg) e un contenuto massimo registrato nel Senatore Cappelli (840 mg/kg). Nel farro dicocco il contenuto medio rilevato è stato di 421 mg/kg, dai 247 mg/kg del farro della Garfagnana coltivato a Parma ai 572 mg/kg del farro della Garfagnana coltivato a Bologna. I contenuti più bassi in assoluto dei peptidi immunotossici sono stati rilevati nel farro piccolo o monococco e nello spelta. Il contenuto medio rilevato nel farro monococco è stato di 166 mg/kg, con il contenuto minimo di 137 mg/kg per ID331 coltivato a Parma e il contenuto massimo, sempre nella stessa varietà, cresciuta a Bologna di 236 mg/kg. Nello spelta il contenuto medio è stato di 225 mg/kg, dal minimo di 63 mg/kg di Rouquin coltivato secondo gli standard dell'agricoltura biologica a Parma al massimo di 436 mg/kg di Rouquin coltivato secondo gli standard dell'agricoltura convenzionale sempre a Parma. Ovviamente, nonostante le quantità in queste due specie sono risultate essere inferiori rispetto alle altre specie, non si può affermare che si tratta alimenti sicuri per i celiaci.

Per quanto riguarda i peptidi tossici il contenuto più basso è quello rilevato nello spelta, mentre il contenuto più alto registrato è stato quello del farro monococco ID331.

Dallo studio di Prandi et al. (2016) è risultato che le varietà antiche non possono essere considerate più sicure, anzi, sembra che contengano più peptidi immunotossici rispetto alle varietà moderne. Non è stata registrata nessuna differenza statisticamente significativa per quanto concerne il contenuto dei singoli peptidi tossici in specie moderne e antiche.

6.5 - LA RIDUZIONE DELLA BIODIVERSITÀ

Coloro che sostengono che l'evoluzione del frumento moderno sia una delle cause dell'incremento dei casi di intolleranza alimentare glutine correlata spesso usano come argomentazione a favore della loro tesi la riduzione della biodiversità. Proprio a causa della ridotta biodiversità, infatti, il rischio sarebbe quello di un'esposizione elevata a composti, determinati da fattori genetici, assunti con l'alimentazione, che possono anche risultare tossici come nel caso degli epitopi della celiachia. Gli studi scientifici inerenti all'argomento, per quanto riguarda questo punto, danno delle risposte non del tutto uniformi e chiare.

Da un certo punto di vista l'uniformità genetica dei prodotti vegetali, come per esempio nel frumento, è auspicabile. Un prodotto avente caratteristiche il più possibile uniformi infatti viene apprezzato maggiormente dal consumatore moderno e permette di standardizzare i processi di trasformazione tecnologica, per esempio nel caso del pane e della pasta, come anche nei prodotti da forno. Basti pensare all'importante fattore costituito dal contenuto proteico totale, per il quale sono anche fissati dei valori minimi dalla legge. Per la pasta, ottenuta dalla semola di frumento duro, il limite è fissato a 10,50 mg/100 g (decreto del Presidente della Repubblica del 9 febbraio 2001, n.187). Inoltre, alcune caratteristiche delle specie vegetali devono essere sempre presenti per permettere livelli di produzione il più possibile elevati. Sempre facendo l'esempio del frumento si è cercato, dagli albori dell'agricoltura, di scegliere piante che producessero cariossidi grandi. Scopo della selezione moderna, per fare qualche altro esempio, è cercare di produrre varietà resistenti all'allettamento, quindi basse, oppure resistenti ad alcune patologie del regno vegetale come le ruggini.

L'uniformità genetica porta con sé anche diverse problematiche. Basti pensare alla Grande Carestia irlandese del 1845 e 1846, causata, tra i vari fattori, dal fungo della peronospora, oppure al più recente attacco da parte di un altro fungo, *Puccinia graminis*, il quale causa la ruggine dello stelo. Questa forma del fungo, particolarmente virulenta, è stata chiamata Ug99, così chiamata perché comparsa la prima volta in Africa, in Uganda nello specifico, nel 1999 (Fu e Somers, 2009).

La questione non è però così semplice, come ci illustrano anche Fu e Somers (2009). Da un lato ci sono le preoccupazioni riguardo alla riduzione della biodiversità, le quali trovano la loro base teorica nella pratica attuata dai moderni programmi di selezione in cui la selezione

si basa su una ristretta gamma di germoplasma vegetale con l'introduzione di pochi alleli nuovi. Dall'altro lato le evidenze sperimentali non sono del tutto chiare riguardo a questo punto. Ovvero sono state effettuate analisi molecolari sul pool genico di colture, prendendo in esame sia varietà antiche che moderne, e non sono state rilevate delle così grandi differenze tra le due categorie.

Questa discrepanza può essere imputata ad una serie di fattori:

- L'intensità con cui viene effettuata la selezione sul materiale vegetale riproduttivo potrebbe variare nei programmi di miglioramento genetico tramite l'utilizzo di diversi metodi di miglioramento per ottenere diversi risultati riproduttivi
- Alcune tecniche di miglioramento genetico potrebbero esercitare un effetto opposto alla riduzione della biodiversità, ad esempio, la manipolazione transgenica e l'introgressione esotica
- Le colture potrebbero rispondere in modo differente metodi colturali diversi da quelli solitamente utilizzati
- Molte analisi della diversità genetica sono, da un punto di vista tecnico, lontane dall'ideale sperimentale atto a poter chiaramente dimostrare o meno la eventuale riduzione della biodiversità

Considerando tutti questi fattori, uno studio che possa effettivamente dimostrare qualcosa in merito dovrebbe avere alcune caratteristiche, quali:

- Essere specifico
- Essere condotto su larga scala
- Coinvolgere un programma di miglioramento genetico di lungo periodo
- Essere utilizzato un numero di marcatori molecolari sufficientemente ampio in modo tale da comprendere l'intero genoma

L'articolo prende in esame, per questo motivo, il programma di miglioramento genetico canadese sul frumento che comprende numerose cultivar, iniziato nel 1886. Sono state prese in esame 75 varietà di frumento tenero (*hard red spring wheat*), immesse sul mercato tra il 1845 e il 2004. Sono stati utilizzati 370 marcatori SSR (*Simple Sequence Repeats*) mappati.

I centri di miglioramento genetico canadesi sono numerosi ma, nonostante ciò, si può affermare che sia stata rispettata una certa uniformità nella selezione, in quanto gli obiettivi da raggiungere sono sempre stati comuni, tra cui la resistenza alle patologie, la produttività, la resistenza allo stress abiotico, la qualità del prodotto finale. Le cultivar sono state

suddivise in sei gruppi, in base all'epoca di distribuzione: prima del 1910, dal 1911 al 1929, dal 1930 al 1949, dal 1950 al 1969, dal 1970 al 1989, dal 1990 al 2004.

Un'ulteriore analisi è stata effettuata su due diversi raggruppamenti di una parte delle 75 cultivar. Questo è stato fatto per evitare degli sbilanciamenti nel campionamento e per rendere la valutazione della diversità più accurata e semplice. In questa parte dello studio sono state raggruppate 20 cultivar antiche (epoca di distribuzione prima del 1933) e 20 cultivar più moderne (epoca di distribuzione dopo il 1991).

Sono state utilizzate 10 cariossidi prelevate in modo casuale, scegliendo tra le accessioni conservate al centro di ricerca Saskatoon (*Crop Development Centre, Department of Plant Science, University of Saskatchewan*), Canada. I materiali sono stati seminati in serra, sono state raccolte giovani foglie da ciascuna pianta ed è stata effettuata l'estrazione del DNA. Ciascuna delle 10 piantine per entrata di ogni varietà è stata genotipizzata con 12 microsatelliti *non linked* essendo presenti in 12 cromosomi diversi per studiare l'eterogeneità intravarietale. Una singola piantina rappresentante il biotipo più abbondante all'interno della cultivar è stata selezionata per applicare un approccio coinvolgente l'intero genoma.

Dall'analisi sono stati individuati 370 loci e 2280 alleli per tutte e 75 le cultivar di frumento tenero. I marcatori utilizzati erano ampiamente distribuiti tra i 21 cromosomi del frumento, con un minimo di 4 marcatori per il cromosoma 4D fino a un massimo di 24 marcatori per il cromosoma 1B e 7A.

La frequenza allelica rilevata è risultata compresa tra 0,01 e 0,99, con una media di 0,14. La maggior parte dei 2280 alleli sono risultati poco frequenti oppure presenti soltanto in alcune delle varietà prese in esame.

Effettivamente, per le cultivar distribuite dopo il 1930, si è potuta osservare una riduzione della frequenza allelica per 36 dei loci SSR, una riduzione che in percentuale è del 9,7%. Nelle cultivar distribuite prima del 1910 erano presenti 423 alleli i quali non sono stati rilevati in cultivar distribuite dopo il 1990.

I dati che riguardano la seconda parte dello studio, che ha visto la suddivisione di 40 cultivar in due gruppi in base all'epoca di distribuzione, sono invece i seguenti. Prima di tutto è stata ottenuta una maggiore risoluzione nei modelli di variazione rispetto alla parte dello studio che comprendeva tutte e 75 le cultivar.

In base all'evidenza raccolta è stato possibile affermare che le modifiche alleliche hanno riguardato ogni parte del genoma. In particolare, Fu e Somers (2009) affermano che:

- All'incirca il 38% degli alleli era presente in entrambi i gruppi, il 18% degli alleli è comparso solo nel gruppo delle varietà recenti, il 44% degli alleli è stato rilevato soltanto nel gruppo delle varietà più antiche.
- È stata messa in luce una riduzione delle diversità allelica per il 16% dei loci presi in esame su 18 dei 21 cromosomi, mentre c'è stata solo una introduzione di nuovi alleli per il 2% dei loci di 4 dei 21 cromosomi del frumento.
- La maggior parte degli alleli perduti (il 76%) o degli alleli nuovi (60%) sono risultati rari essendo stati trovati soltanto in una cultivar. La frequenza degli alleli rari è diminuita confrontando varietà antiche e moderne, mentre è aumentata nelle varietà moderne la frequenza degli alleli più frequenti.
- È aumentato il disequilibrio di *linkage*, ovvero di associazione, nelle cultivar moderne
- I due gruppi di cultivar sono risultati profondamente differenti

Lo studio indica che la riduzione del pool genico del frumento tenero canadese si è verificata soprattutto a partire dal 1930. Nonostante ciò restano alcune perplessità, ovvero gli autori dell'articolo precisano, concludendo, che sulla base dei loro risultati non è possibile indicare se la riduzione allelica individuata ha un qualche valore adattativo o se gli alleli non più presenti erano associati a caratteristiche non desiderate, le quali sono state eliminate con la selezione del frumento, e nemmeno se gli alleli eliminati erano associati a geni selezionati in aree cromosomiche vicine.

6.6 - QUANTO GLUTINE ASSUMIAMO CON L'ALIMENTAZIONE?

Il glutine, che si viene a formare negli alimenti contenenti glutenine e prolamine, viene assunto tramite numerosi cibi. Oltre agli alimenti che contengono naturalmente queste frazioni proteiche ci sono anche altri cibi, anche "insospettabili", ai quali il glutine viene aggiunto. Si tratta di alimenti trasformati e assemblati a livello industriale, il glutine conferisce caratteristiche tecnologiche desiderabili. Nell'articolo di Kasarda (2013) sono riportati dati riguardo al consumo di glutine. Questi dati si riferiscono alla popolazione statunitense tra il 1900 e il 2008, e provengono dall'*Economic Research Service – USA Gov*.

Ovviamente la fonte principale di glutine sono gli alimenti derivati da quei vegetali che contengono naturalmente glutine, tra cui, per esempio, la farina. Nel 1900 il consumo di farina, di qualsiasi tipologia, era di 100 kg per persona all'anno. Questo consumo è diminuito a 50 kg nel 1970, per poi risalire a 66 kg nel 2000 e diminuire di nuovo, leggermente, nel 2008, con 61 kg pro capite. Tenendo conto del fatto che il contenuto medio in proteine delle specie da cui si ottiene farina è del'11%, e avvalendosi del dato più recente, ovvero che il consumo di glutine pro capita è di 61 kg all'anno, il consumo di glutine a persona sarebbe di 5 kg all'anno.

Kasarda (2013) analizza poi come il quantitativo di glutine assunto con la dieta potrebbe essere cambiato con l'introduzione di alimenti ai quali il glutine viene artificialmente aggiunto. Questa tipologia di glutine viene anche definita *vital gluten,* il glutine vitale, ottenuto tramite il frazionamento del glutine dalla farina di frumento, allontanando i granuli di amido dall'impasto, addizionato poi ai prodotti alimentari in forma essiccata.

Non essendoci abbastanza dati riguardo alla produzione di glutine vitale degli Stati Uniti e riguardo alla sua importazione, Kasarda (2013) fa una serie di stime. Se l'importazione di glutine era di 80 x 10^6 kg nel 1997 e di 175 x 10^6 kg nel 2007, tramite una estrapolazione lineare a due punti si può dire che nel 2012 l'importazione sarebbe stata di 222 x 10^6. Considerando che la popolazione degli Stati Uniti è di 330 milioni, che il 75% del glutine vitale è rappresentato da proteine e che l'80% di questa tipologia di glutine viene utilizzata per gli alimenti destinati al consumo umano, ogni persona ne assumerebbe, all'anno, 408 g. Facendo lo stesso calcolo il consumo di glutine nel 1977, per persona, sarebbe stato di 136 g.

Secondo questi calcoli sembrerebbe che il consumo di glutine è triplicato dal 1977 al 2012. Questo dato sembrerebbe in accordo con i dati che indicano anche un incremento della diffusione della celiachia.

Kasarda (2013) prosegue nella sua analisi affermando che, nonostante il consumo di farina di frumento stia leggermente scendendo negli ultimi anni, facendo riferimento al lasso di tempo compreso tra il 1970 e il 2000, si può comunque concludere che c'è stato un incremento nel consumo di farina di frumento di 15,9 kg per persona in questo periodo. Considerando ciò ci sarebbe stato un incremento del consumo di glutine assunto con la farina di 1,3 kg pro capite per anno. Nel 1970 il consumo di glutine tramite l'assunzione di farina era di 4.1 kg, nel 2000 di 5,4 kg.

Nell'articolo si sottolinea inoltre che spesso il glutine vitale viene aggiunto ai prodotti *whole grain*, ovvero integrali, per migliorare le caratteristiche tecnologiche di questi alimenti. Quindi spesso, volendo fare una scelta salutare, ci si espone a un'ulteriore fonte di glutine. Oltre a questa considerazione però non ci sono evidenze al momento che dimostrino se questa aggiunta abbia un qualche effetto sulla salute del consumatore.

Il consumo di frumento e di glutine potrebbero essere coinvolti nell'incremento di casi di intolleranza al glutine ma per affermare questo con assoluta certezza mancano i dati dell'incidenza della celiachia anno per anno.

6.7 - CONFRONTO TRA COMPONENTI BIOATTIVE NELLE SPECIE DEL GENERE *TRITICUM* ANTICHE E MODERNE

Oltre alla componente proteica, quella che costituisce il glutine, le varietà antiche e moderne di specie appartenenti al genere *Triticum* sono state confrontate anche in relazione ad altri aspetti, ovvero componenti bioattivi quali la fibra, gli acidi fenolici, gli alchilresorcinoli, i tocoli, i carotenoidi e le vitamine del gruppo B (Shewry e Hey, 2015).

Il confronto, per quanto riguarda questi componenti, non è reso facile da una serie di fattori. Tra questi troviamo soprattutto i metodi colturali. Spesso i frumenti antichi vengono coltivate secondo gli standard dell'agricoltura biologica oppure in situazioni dove la produzione non è particolarmente intensiva, mentre le varietà moderne vengono coltivate soprattutto in modo intensivo. Inoltre, per ottenere dei dati che siano statisticamente significativi, si devono prendere in esame un numero sufficiente di varietà. Queste varietà andranno prese in esame e coltivate in una serie di ambienti diversi, per poter stabilire quali siano gli effetti dovuti all'interazione tra genotipo e ambiente.

Nell'articolo sopra citato qui preso in esame vengono considerati materiali di antica coltivazione di farro monococco, farro dicocco e spelta mentre vengono considerati materiali moderni il frumento duro e il frumento tenero.

La fibra totale (solubile e insolubile), che nelle cariossidi integrali è presente in una percentuale tra l'11,5% e il 15,5%, è costituita principalmente da arabinoxilani (5,5% - 7,4%), cellulosa (1,67% - 3,05%), β-glucani (0,51% - 0,96%), lignina (0,74% - 2,03%). Negli strati più esterni, quindi nel pericarpo e nella testa, il quantitativo di fibra presente è

tra il 45-50% e sono presenti soprattutto lignina, cellulosa e una forma particolare di arabinoxilani, i glucoarabinoxilani. A livello dello strato aleuronico la fibra è presente in una percentuale del 35-40%, sono presenti β-glucani, arabinoxilani e in misura molto ridotta cellulosa e lignina. Nell'endosperma, ricco di amido, il quantitativo di fibra è ridotto di molto (circa 2-3%) e sono presenti soprattutto arabinoxilani, β-glucani e una piccola percentuale di glucomannani e cellulosa.

Ci sono, oltre a quelli elencati, altri due componenti della fibra presenti in percentuali basse. Si tratta di fruttani (fruttooligosaccaridi) e una piccola parte di amido resistente.

La percentuale di fibra presente nelle cariossidi è correlata alle dimensioni delle cariossidi stesse. Quando queste sono piccole la componente di crusca è maggiore. Quando le cariossidi sono grandi, invece, ad aumentare è soprattutto la componente amidacea, e, in proporzione, la componente di crusca sarà inferiore. In genere le cariossidi grandi sono una delle caratteristiche ritenute importanti per le cultivar moderne, ovvero quelle coltivate in intensivo. Nonostante ciò le specie di antica coltivazione, farro dicocco, farro monococco e spelta, sembrano avere un contenuto in fibra totale inferiore rispetto al frumento duro e a quello tenero. Come fonte viene citato uno studio, l'EU HEALTHGRAIN project (Poutanen et al., 2008, 2010), che ha confrontato 151 varietà di frumento tenero, 10 di frumento duro, e, rispettivamente, 5 linee di spelta, farro dicocco, farro monococco. Oltre alla quantità totale di fibra sono stati determinati anche le percentuali di lignina e β-glucani. I quantitativi di fibra totale rilevati, in media, sono:

- Frumento tenero 15,1%
- Frumento duro 13,4%
- Spelta 12,0%
- Farro monococco 11,0%
- Farro dicocco 9,8%

Viene sottolineato che un limite di questo studio potrebbe essere stato la ridotta diversità tra le linee di farro dicocco e farro monococco.

Occorre specificare che la determinazione della fibra nei cereali è molto complessa, anche se si fa ricorso a metodi ufficiali c'è sempre molta discordanza nei risultati. Il problema riguarda il metodo di confronto e i protocolli sperimentali e, più nello specifico, il numero di campioni analizzati all'interno di ciascuna specie.

Ancora nell'ambito dell'EU HEALTHGRAIN project sono state prese in considerazione altre componenti bioattive, quali: gli acidi fenolici, gli alchilresorcinoli, i tocoli, i carotenoidi e le vitamine del gruppo B. Anche qui i risultati potrebbero essere stati influenzati dal ridotto numero di campioni presi in esame per alcune specie, ovvero per farro dicocco, farro monococco, spelta e frumento duro. Infatti, prendendo in esame un numero elevato di varietà per ciascuna specie, come nel caso del frumento tenero, si può notare che c'è una grande variabilità intervarietale. Per avere quindi dei dati il più possibile attendibili si dovrebbe analizzare, per ciascuna specie, un numero di campioni sufficientemente elevato.

Per quanto riguarda il contenuto in acidi fenolici i dati mostrano dei quantitativi simili in specie antiche e moderne.

Gli alchilresorcinoli, un gruppo di lipidi fenolici, invece erano presenti in quantità superiori in farro dicocco, spelta e farro monococco rispetto al frumento duro e tenero. Essendo presenti però soprattutto negli strati esterni il loro quantitativo è chiaramente più elevato nelle specie aventi cariossidi piccole, quindi quelle antiche.

La categoria dei tocoli era presente in percentuali elevate soprattutto nel farro monococco, mentre, considerando nello specifico il contenuto di α-tocoferolo, questo era molto simile in tutte le specie prese in esame.

Per quanto riguarda i carotenoidi questi erano presenti soprattutto sotto forma di xantofille (luteina e zeaxantina) e α e β carotene. Il carotenoide più frequentemente rilevato è stato la luteina, contenuta in quantità elevate soprattutto nel farro monococco, e in quantità inferiori nel farro dicocco e frumento duro. Il quantitativo più basso in assoluto di carotenoidi è stato quello rilevato nel frumento tenero.

Le vitamine del gruppo B, quindi tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), piridossina (B6) e folati (B9) erano rappresentate in misura leggermente superiore, rispetto alle altre specie, nel frumento duro.

In conclusione, i dati riportati non indicano che ci sia una reale differenza tra frumenti antichi (quindi *T. monococcum, T. dicoccum* e *T. spelta*) e le varietà moderne di *Triticum* (*T. durum* e *T. aestivum*) per quanto riguarda il loro contenuto in componenti bioattive. I frumenti antichi quindi non possono, in base a questi dati, essere considerate scelte più salutari per il consumatore. L'unica interessante differenza è quella che riguarda il contenuto piuttosto elevato di luteina nel farro monococco (7,28 μg/g rispetto a 1,55 μg/g del frumento tenero).

Nonostante la luteina non agisca da provitamina A, potrebbe comunque avere un effetto positivo sulla funzione visiva e la salute dell'occhio per alcune popolazioni le quali hanno un apporto non sufficiente di vitamina A.

7 - CONCLUSIONI

In base agli articoli scientifici presi in esame non è possibile affermare che ci sia l'inequivocabile evidenza che i frumenti moderni siano in qualche modo coinvolti con l'incremento delle patologie correlate al consumo di glutine. Anzi, ci sono studi che sembrano indicare che siano i frumenti antichi a contenere un maggior quantitativo di composti in grado di elicitare una reazione avversa (Prandi et al., 2016).

Il consumatore viene purtroppo esposto a una serie di messaggi privi di ogni fondamento scientifico, facilmente reperibili soprattutto in rete. Quindi non è sufficiente che le persone vengano stimolate ad informarsi, sarebbe prima di tutto importante spiegare che ci sono diverse tipologie di informazioni, alcune delle quali sono più veritiere di altre, in quanto hanno delle solide basi teoriche, ovvero studi scientifici documentati.

Per quanto riguarda la pubblicizzazione dei frumenti antichi, i quali attualmente sono molto di moda, spesso si tratta di una semplice questione di marketing. Le persone, sensibilizzate dalle false informazioni, acquistano molto volentieri dei prodotti che purtroppo non hanno le caratteristiche sperate. Tutto ciò non sta a significare che i frumenti antichi siano dei prodotti da evitare, anzi, sarebbe giusto acquistare anche tali prodotti ma in modo consapevole. Non si dovrebbe scegliere una farina di frumento ottenuta da una varietà antica pensando di scegliere un prodotto a basso contenuto proteico oppure a basso contenuto di glutine. Si potrebbe optare per l'acquisto di una farina ottenuta da una varietà antica di frumento perché si decide di alimentarsi con una più ampia varietà di prodotti oppure perché si tratta di un prodotto reperibile in piccole aziende legate al territorio e contribuire alla conservazione e valorizzazione della biodiversità locale, le quali decidono di produrre prodotti di qualità, rispettando l'ambiente. Si potrebbe anche optare per l'acquisto del frumento prodotto in queste piccole realtà in forma non macinata, macinarlo in casa

ottenendo così un prodotto veramente integrale (e non una farina raffinata aggiunta di crusca), da utilizzare per la produzione di pane e pasta fatta in casa.

I prodotti integrali sono una fonte concentrata di vitamine, minerali e proteine (Cooper, 2015). Si tratta di costituenti di cui è stata privata la farina bianca, in quanto sono composti che si concentrano in quelle parti della cariosside che vengono allontanate in questa tipologie di prodotto. Le parti della cariosside (Figura 21) che vengono allontanate per ottenere la farina bianca sono il pericarpo, quindi la parte esterna della cariosside, ricca di fibre, lo strato aleuronico, il quale si trova immediatamente sotto al pericarpo, in cui sono presenti vitamine, minerali e lipidi, albumine e globuline, ovvero proteine ad alto valore biologico in quanto contengono amminoacidi essenziali (a differenza delle gliadine e delle glutenine), e il germe, ricco di vitamina E, vitamine del gruppo B e triacilgliceroli esterificati soprattutto con acido linoleico, acido oleico e acido α-linolenico.

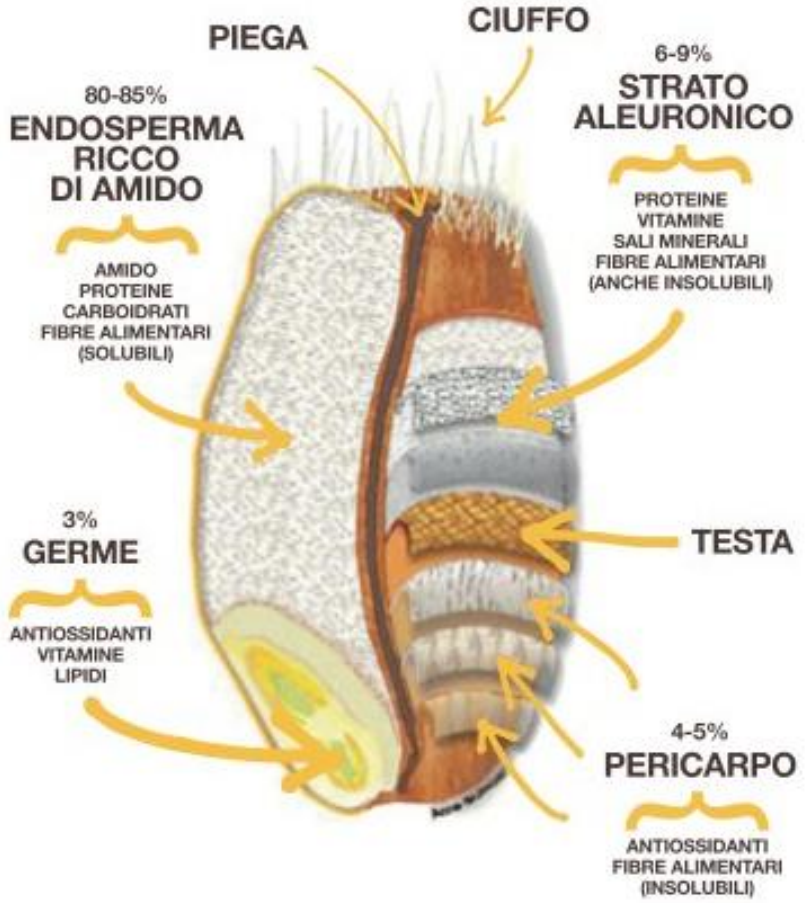

Figura 21 La cariosside di frumento

(https://ildiariodigiulia.wordpress.com/2013/06/18/la-ricetta-e-larte-prima-di-cominciare/)

Si possono fare alcune considerazioni finali riguardo alle future prospettive per lo sviluppo di frumenti a ridotto contenuto di epitopi tossici per il celiaco. Non si tratta di un obiettivo semplice da raggiungere per una serie di motivi. Il primo motivo è che gli epitopi tossici non si concentrano soltanto in una delle componenti del glutine, ovvero a livello delle α-gliadine. Si concentrano prevalentemente a questo livello, ma non esclusivamente. In secondo luogo, le gliadine e le glutenine sono codificate da geni situati in loci complessi, multigenici, e difficilmente avviene ricombinazione a livello di questi loci. Sarà quindi opportuno selezionare non per singoli componenti, ma per gruppi di proteine. In terzo luogo, sarà anche necessario fornire a coloro che si occupano miglioramento genetico gli strumenti atti a individuare le progenie appropriate nell'ambito dei programmi di selezione. Infine, come indicato da Shewry e Tatham (2016), bisognerà tenere in debita considerazione come una selezione di questo tipo andrà ad impattare su altre importanti caratteristiche del frumento, quali ad esempio la resa e la qualità tecnologica.

BIBLIOGRAFIA

Bressanini, **D**., **Mautino**, **B.**, 2017, *Contro natura*, Milano, Rizzoli

Costantini, **A**.**M**., **Cannella**, **C**., **Tomassi**, **G**., 2016, *Alimentazione e nutrizione umana*, Roma, Il pensiero scientifico editore

Cooper, R., 2015, *Re-discovering ancient wheat varieties as functional foods*, in "*Journal of Traditional and Complementary Medicine*", 3, pp. 138-143

Czaja-Bulsa, **G**., 2015, *Non coeliac gluten sensitivity: a new disease with gluten intolerance*, in "*Clinical Nutrition*", 34, pp. 189-194

De Santis, **M**.**A**., **Giuliani**, **M**.**M**., **Giuzio**, **L**., **De Vita**, **P**., **Lovegrove**, **A**., **Shewry**, **P**.**R**., **Zina Flagella**, **Z**., 2017, *Differences in gluten protein composition between old and modern durum wheat genotypes in relation to 20th century breeding in Italy*, in *"European Journal of Agronomy"*, 87, 19-29

De Stefano, S., Silano, M., 2015**,** *Relazione annuale al Parlamento sulla celiachia*, Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione, Ministero della salute

Diamond, J., 1997, *Guns, germs and steel: the fates of human societies*, New York, W.W. Norton & Company

Dowd, **B**., **Walker-Smith**, **J**., 1974, *Samuel Gee, Aretaeus, and The Coeliac Affection*, in "*British Medical Journal*", 2, pp. 45-47

Fasano, A., Sapone, A., Zevallos, V., Schuppan, D., 2015, *Nonceliac gluten sensitivity*, in "*Gastroenterology*", 6, pp. 1195-1204

Fu, **J**.**-B**., **Somers**, **D**., 2009, *Genome-Wide Reduction of Genetic Diversity in Wheat Breeding*, in *"Crop Science"*, 49, pp. 161-168

Giuliani, M.M., Palermo, C., De Santis, M.A., Mentana, A., Pompa, M., Giuzio, L., Masci, S., Centonze, D., Flagella, Z., 2015, *Differential Expression of Durum Wheat gluten proteome under water stress during grain filling,* in *"Journal of Agricultural and Food Chemistry"*

Gujral, **N**., **Freeman**, **H**.**J**., **Thomson**, **A**. **BR**, 2012, *Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment*, in "*World Journal of Gastroenterology"*, 18 (42), pp. 6036-6059

Hurkman, W.J., Tanaka, C.K., Vensel, W.H., Thilmony, R., Altenbach, S.B., 2013, *Comparative proteomic analysis of the effect of temperature and fertilizer on gliadin and glutenin accumulation in the developing endosperm and flour from Triticum aestivum L. cv. Butte 86,* in *"Proteome science",* pp. 1-15

Kasarda, **D**.**D**., 2013, "*Can an Increase in Celiac Disease Be Attributed to an Increase in the Gluten Content of Wheat as a Consequence of Wheat Breeding?",* in *"Journal of Agricultural and Food Chemistry",* 61, pp. 1155-1159

Lebwohl, **B**., **Ludvigsson**, **J**.**F**., **Green**, **P**.**H**.**R**., 2015, *Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity*, in "*BMJ*", pp.1-13

Porfiri, O., 2014, *I frumenti*, Savona, Pentàgora

Poutanen, K., Shepherd, R., Shewry, P.R., Delcour, J.A., Björck, I., van der Kamp, J.W., 2008, *Beyond whole grain: the European HEALTHGRAIN project aims at healthier cereal foods,* in "*Cereal Foods World*", 53, pp. 32-35

Poutanen, K., Shepherd, R., Shewry, P.R., Delcour, J.A., Björck, I., van der Kamp, J.W., Ranieri, R., 2010, *More of the grain – progress in the HEALTHGRAIN project for healthy cereal foods,* in "*Cereal Foods World*", 55, pp. 79-84

Prandi, B., Tedeschi, T., Folloni, S., Galaverna, G., Sforza, S., 2016, "*Peptides from gluten digestion: a comparison between old and modern wheat varieties*", in "*Food Research International*", 91, pp. 92-102

Ribeiro, M., Rodriguez-Quijano, M., Nunes, F.M., Carrillo, J.M., Branlard, G., Igrejas, G., 2016, *New insights into wheat toxicity: breeding did not seem to contribute to a prevalence of potential celiac disease's immunostimulatory epitopes,* in "*Food Chemistry*", 213, pp. 8-18

Salvi, S., 2016, *L'uomo che voleva nutrire il mondo*, Pollenza, Accademia Georgica - Treia

Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P. HR, Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D.S, Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C., Fasano, A., 2012, *Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification*, in "*BMC Medicine*", 10, pp. 1-12

Shewry, R.P., Hey, S., 2015, *Do "ancient" wheat species differ from modern bread wheat in their contents of bioactive components,* in *"Journal of Cereal Science"*, 65, pp. 236-243

Shewry, R.P., Tatham, A.S., 2016, *Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality,* in *"Journal of Cereal Science"*, 67, pp. 12-21

Van Berge-Henegouwen, G.P., Mulder, C.J., 1993, *Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten-free diet,* in "*Gut*", 34, pp. 1473-1475

Van den Broeck, H.C., de Jong, H.C., Salentijn, E.M.J., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R.J., Gilissen, L.J.W.J., van der Meer, I.M., Smulders, M.J.M., 2010, *Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding*

may have contributed to increased prevalence of celiac disease, in "*Theoretical and Applied Genetics*", 121, pp. 1527-1539

SITOGRAFIA

Sito AIC (http://www.celiachia.it/AIC/AIC.aspx?SS=351&M=863) , pagina visitata il 10/11/2017

Sito Aoecs (http://www.aoecs.org/), pagina visitata il 10/11/2017

Sito Dr. Schär Institute (http://www.drschaer-institute.com/it/articoli-specialistici/la-mappa-mondiale-della-celiachia-1229.html, pagina visitata il 10/11/2017

Sito Epicentro (http://www.epicentro.iss.it/problemi/celiachia/epidItalia.asp), pagina visitata il 10/11/2017

Sito Le Scienze (http://bressanini-lescienze.blogautore.espresso.repubblica.it/2010/03/22/il-senatore-cappelli-e-gli-altri-grani-di-nazareno-strampelli/), pagina visitata il 26/10/2017

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare in modo particolare il prof. Fabio Veronesi, relatore di questa tesi di laurea, per aver accettato di aiutarmi a scrivere questa tesi, per le sue conoscenze, l'interessamento, la pazienza e per il costante supporto datomi durante questo percorso.

Un grande ringraziamento anche al mio correlatore, il dott. Renzo Torricelli, per tutta la disponibilità e il gentile e costante aiuto che mi hanno permesso di completare questo lavoro.

Ringrazio anche il prof. Stefano Fiorucci, mio docente di gastroenterologia e coordinatore della sezione di gastroenterologia del dipartimento di scienze chirurgiche e biomediche di Perugia, per le preziose indicazioni fornitemi riguardo ai capitoli sulla celiachia e sulle patologie legate al consumo di frumento e glutine.

Vorrei infine ringraziare la dott. Oriana Porfiri per essersi interessata al mio lavoro, per gli articoli che mi ha indicato e per il suo prezioso libro sui frumenti.