

Capítulo 23

Variedades de trigo aptas para celíacos

María J. Giménez, Francisco Barro

Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 14080 Córdoba, España.

mjga06@ias.csic.es, fbarro@ias.csic.es

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.140>

Referenciar este capítulo

Giménez MJ, Barro F. *Variedades de trigo aptas para celíacos*. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 463-477.

Resumen

El trigo cultivado es genéticamente muy complejo debido a su origen a partir de especies diploides ancestrales mediante procesos de hibridación natural y posterior poliploidización. Los trabajos realizados hasta la fecha han mostrado que todas las variedades de trigo cultivadas y las especies silvestres emparentadas contienen epítomos tóxicos. El ARNi es una herramienta excelente para el silenciamiento específico de genes. Con esta tecnología se han eliminado los epítomos tóxicos presentes en los tres grupos de gliadinas del trigo harinero. Los anticuerpos monoclonales mostraron una disminución en la presencia de gluten tóxico cercana al 98%. Los ensayos con linfocitos T de extractos proteicos procedentes de las nuevas líneas de trigo eran 100 veces menos reactivos que sus genotipos parentales. Estos resultados suponen un importantísimo avance en la consecución de trigos aptos para los celíacos. Diversos estudios muestran que la ingesta diaria de entre 10 y 50 mg de gluten pueden ser seguros para los celíacos, por lo que las líneas descritas en este artículo podrían servir para la elaboración de productos para celíacos. El carácter “silenciamiento de gliadinas” puede ser transferido mediante cruzamiento a variedades comerciales de trigo permitiendo disponer de suficiente variabilidad genética para obtener líneas aún menos tóxicas que las ya producidas. Más aún, estas líneas podrían servir de base para tratar otras patologías relacionadas con el gluten como son la anafilaxis dependiente de ejercicio físico y la sensibilidad al gluten.

Abstract

Cultivated wheat is genetically very complex due to its origin from ancestral diploid species through a process of natural hybridization and subsequent polyploidization. All cultivated wheat varieties and their wild relatives contain toxic epitopes in relation to coeliac disease. RNAi is an excellent tool for silencing single or group genes. Using this technology in combination with genetic transformation, we have down-regulated toxic epitopes present in the ω -, γ - and α -gliadins of bread wheat. Monoclonal antibodies showed a decrease in the presence of toxic gluten close to 98%. Protein extracts from those lines were assayed using specific T cells for DQ2 and DQ8 epitopes, showing that the new wheat lines were 100 times less reactive than their parental genotypes. These results represent a major breakthrough in achieving wheats suitable for CD patients. The silencing of gliadins is a new breeding trait and can be transferred by crossing to elite wheat varieties. A daily intake between 10 and 50 mg of gluten could be safe for most CD patients, suggesting that the transgenic lines reported here could be used in foodstuff tolerated by many CD patients. Moreover, these lines could serve as a basis for treating other gluten pathologies such as Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis and gluten sensitivity.

1. Introducción

Aunque la enfermedad celíaca (EC) es conocida desde la Antigüedad, las primeras referencias relacionando la ingesta de ciertos alimentos con la misma no aparecieron hasta finales del siglo XIX. Durante la primera mitad del siglo XX el efecto pernicioso del pan ya era conocido, pero no fue hasta después de la Segunda Guerra Mundial que Dicke, Weijers y Van De Kamer¹ señalaron que ciertos granos de cereales, especialmente de trigo y centeno, eran perjudiciales para los niños con enfermedad celíaca, probando el papel del gluten como agente desencadenante de la enfermedad. Desde entonces, la dieta sin gluten es la única terapia eficaz para combatirla y, durante este tiempo, se han hecho grandes avances en la identificación de los elementos dentro del gluten responsables de provocar la enteropatía. A simple vista pudiera parecer que, una vez conocidos, los epítomos tóxicos podrían fácilmente eliminarse mediante técnicas de mejora genética vegetal y, de ese modo, obtener variedades aptas para el consumo de los celíacos. De hecho, un proceso semejante se ha llevado a cabo desde el inicio de la agricultura con otros cultivos, cuyas especies cultivadas ya no producen las sustancias tóxicas (o lo hacen en menor medida) que en muchas ocasiones sí presentan las especies silvestres de las que derivan como, por ejemplo, antinutritivos en legumbres, glucosinolatos en coles y, más recientemente, ácido erúxico en colza. En el caso del trigo, el principal de los cereales con gluten, no es una tarea simple debido a la complejidad genética del mismo así como la de las proteínas que componen este último.

2. El trigo

El término trigo designa al conjunto de cereales, tanto cultivados como silvestres, del género botánico *Triticum*, tribu *Triticeae*, perteneciente a la subfamilia *Poideae* de la familia de las gramíneas. La cebada y el centeno se incluyen en la misma tribu que el trigo mientras que la avena pertenece a otra tribu de la misma subfamilia. Otras gramíneas de gran importancia son el maíz y el arroz que, junto con el trigo, son los principales cereales de la dieta básica de la humanidad.²

El grano del trigo es utilizado para hacer harina, sémola, cerveza y una gran variedad de productos alimenticios, existiendo cierta especificidad en cada región del mundo en cuanto a los tipos de trigo que se utilizan para cada uso; en los miles de años transcurridos desde el inicio de su cultivo, cada cultura ha desarrollado hábitos y costumbres respecto de las características de ese consumo.

Desde el punto de vista genético, el trigo cultivado es muy complejo debido a su origen a partir de especies diploides ancestrales mediante procesos de hibridación natural y posterior poliploidización. Las dos especies de trigo de importancia agrícola, el duro (para fabricación de pastas), y harinero (el 90% de todo el trigo producido en el mundo), son tetraploide (dos genomas, AABB) y hexaploide (tres genomas, AABBDD), respectivamente (Figura 1). El primero se originó en la naturaleza mediante la hibridación espontánea de dos especies diploides hace 0,5 y 2 millones de años, cada una donadora de los genomas A y B. El trigo harinero (AABBDD) se originó en los campos de cultivo, hace unos 8.000 años, mediante la hibridación espontánea

entre el trigo duro (AABB) y *A. tauschii*, una especie diploide donadora del genoma D (Figura 1). Todas las especies de trigo poseen un número cromosómico múltiplo de 7, contando las especies diploides, tetraploides y hexaploides con 14, 28 y 42 cromosomas, respectivamente. Los cromosomas de trigo se nombran por un número y una letra que indican el genoma del que procede. Debido al estrecho parentesco entre las especies donadoras de los genomas A, B y D, para cada par de cromosomas homólogos de uno de los genomas, presentes en el trigo harinero, existe un par de cromosomas semejantes (homeólogos) en los otros genomas. En la práctica, la composición poliploide del trigo implica que cada uno de sus genes se encuentra codificado por duplicado (trigo duro) o triplicado (trigo harinero), por lo que la modificación de un carácter mediante mejora genética implica un mayor esfuerzo que el que habría de realizarse para una especie diploide.

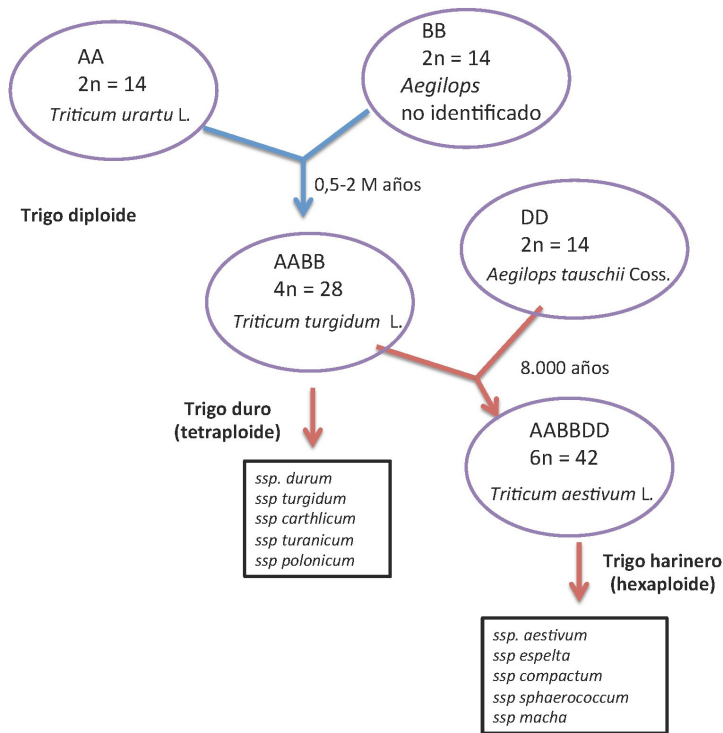


Figura 1. Origen del trigo harinero (hexaploide) y trigo de pasta (tetraploide) a partir de ancestros diploides y posterior poliploidización. El trigo harinero, que representa el 90% del trigo que se cultiva en el mundo, tiene un origen muy reciente.

3. Las proteínas del trigo

El grano de trigo está constituido por proteínas con funciones estructurales o metabólicas y proteínas de reserva (gluten).³ Estas últimas tienen como función proveer de sustancias nutritivas, amino ácidos, a la plántula en los primeros estadios del desarrollo. De acuerdo con la

clasificación original de Osborne⁴ basada en las diferencias de solubilidad de las proteínas del grano de trigo, éste estaría compuesto de albúminas, globulinas, prolaminas (gliadinas) y glutelinas (gluteninas). El gluten representa el 80% del total de proteína del grano y estaría formado por gliadinas y gluteninas (Figura 2), que presentan propiedades físicoquímicas diferentes debido a su distinta habilidad para formar polímeros. Mientras que las gliadinas son monoméricas, las gluteninas se ensamblan en polímeros, estabilizados por puentes disulfuro que las mantienen físicamente unidas entre sí, formando enormes agregados de tamaño variable. Estas proteínas son las más grandes que se conocen en la naturaleza.

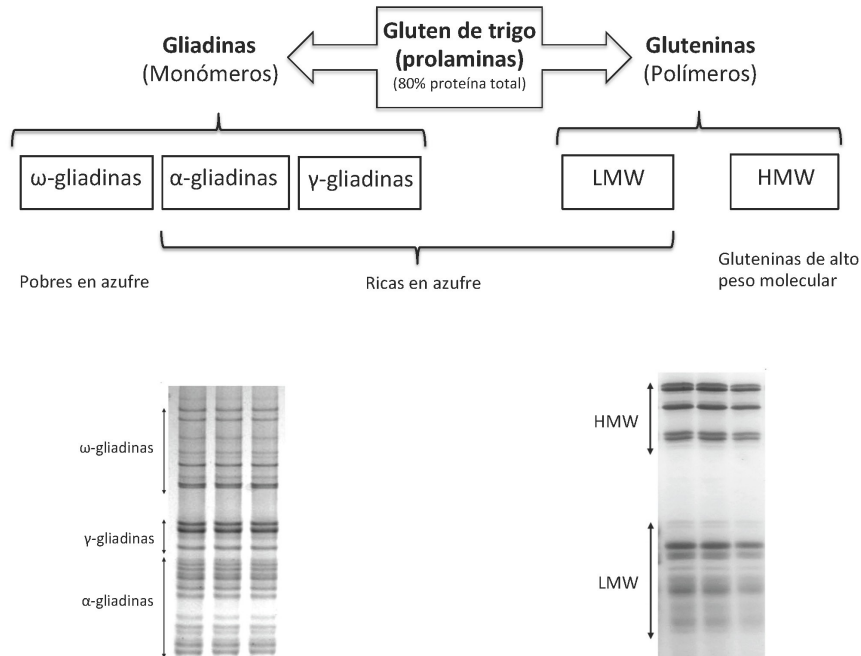


Figura 2. Composición del gluten de trigo. El gluten es una mezcla compleja de proteínas pertenecientes a dos grandes grupos: las gluteninas y las gliadinas. Mientras que las gluteninas forman polímeros las gliadinas permanecen como monómeros. Las proteínas de cada grupo puede extraerse y separarse en geles SDS-PAGE (gluteninas) y geles A-PAGE (Gliadinas). Las gluteninas están formadas por gluteninas de alto (HMW) y bajo (LMW) peso molecular. Las gliadinas están formadas por tres grupos estructurales; ω -, γ - y α -gliadinas.

La clasificación de las proteínas del gluten basada en la solubilidad está hoy superada gracias al conocimiento de su naturaleza y genética, de modo que las gluteninas también deben ser consideradas prolaminas por ser solubles en etanol acuoso tras la reducción de los puentes disulfuro intercatenarios y porque, además, están estrechamente relacionadas por su evolución con las gliadinas.⁵ Dentro de las gluteninas se distinguen dos fracciones en función de su separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE): gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW, de sus siglas en inglés, respectivamente), mientras que las gliadinas se clasifican a su vez en tres grupos estructurales:

α -, γ - and ω -gliadinas según su movilidad en geles de poliacrilamida a pH ácido (A-PAGE) (Figura-2).

El gluten es, por lo tanto, un complejo de proteínas cuya regulación genética es también compleja. Las especies diploides de trigo contienen dos genes de gluteninas HMW, estrechamente ligados, codificados en el *locus Glu-1* del brazo largo del cromosoma 1, y un grupo de genes de gluteninas LMW, también estrechamente ligados entre sí, codificados por el *locus Glu-3* del brazo corto del cromosoma 1. Las gliadinas ocurren en grupos de genes ligados (bloques) localizados en el brazo corto de los cromosomas 1 y 6 (Figura 3). La mayoría de las γ - y ω -gliadinas están localizadas en el *locus Gli-1* del brazo corto del cromosoma 1, a poca distancia del *locus Glu-3* (subunidades de gluteninas de LMW), mientras que las α -gliadinas están controladas por el *locus Gli-2* presente en el brazo corto del cromosoma 6. Existen también otros *loci* menores en el brazo corto del cromosoma 1 que regulan algunas gliadinas y gluteninas LMW. Cada uno de los bloques incluye un número variable de genes que se heredan como un locus, siendo muy difícil separar un gen de gliadina de otro, dentro del mismo bloque, mediante recombinación genética. Como el trigo harinero posee tres genomas, su complemento es tres veces mayor: varios cientos de genes de proteínas diferentes que se heredan en bloques, siendo la mayoría de ellas gliadinas y gluteninas LMW.

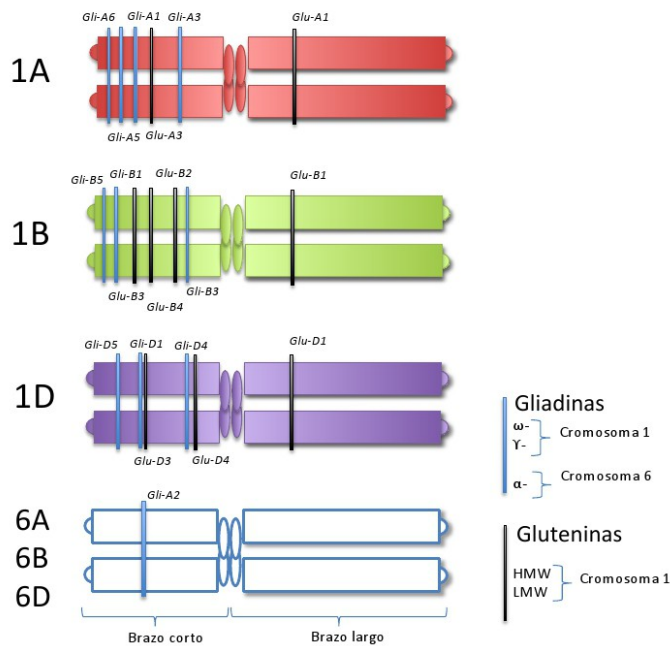


Figura 3. Localización cromosómica de los loci de gluteninas y gliadinas en trigo hexaploide. Las gluteninas de alto peso molecular se localizan en el brazo largo del grupo de cromosomas 1. Las ω - y γ -gliadinas se localizan en varios loci en el brazo corto del grupo de cromosomas 1 mientras que las α -gliadinas se localizan en el cromosoma 6. Las gluteninas de bajo peso molecular se localizan también en el brazo corto del grupo de cromosomas 1 estrechamente ligadas a los loci de gliadinas.

4. La fracción tóxica del gluten

La norma del código alimentario relativa a los alimentos para regímenes especiales destinados a personas intolerantes al gluten (CODEX STAN 118 – 1979) entiende por gluten “una fracción proteínica del trigo, el centeno, la cebada, la avena o sus variedades híbridas y derivados de los mismos, que algunas personas no toleran y que es insoluble en agua y en 0,5M NaCl”. Es más, en el mismo código se recoge una definición de “prolaminas” identificándola con “gliadinas” que, a pesar de haber sido señalada como incorrecta, no ha sido corregida en la última revisión de 2008. Estas definiciones de gluten y prolaminas pueden llevar a la confusión por lo que es importante aclarar que no todas las proteínas del gluten son tóxicas, y que aquellas tóxicas, no lo son en la misma medida. Nosotros usaremos el término gluten para referirnos a la totalidad de la fracción de prolaminas, y no debe confundirse con el gluten de los alimentos para celíacos, que en realidad se refiere al contenido en la porción tóxica del mismo. A este último nos referiremos como gluten tóxico.

Las proteínas del gluten de trigo son ricas en los aminoácidos prolina (15%) y glutamina (30%) y presentan contenidos inusualmente bajos en los ácidos aspártico y glutámico. La elevada cantidad de prolina es la causa de que las proteínas del gluten sean difícilmente digeridas por las proteasas gastrointestinales, resultando en péptidos relativamente grandes que se acumulan en el intestino delgado.⁶ Estos péptidos son sustratos perfectos para la desamidación de residuos de glutamina en glutamato mediada por la transglutaminasa 2 (TG2), fundamental para la creación de epítomos estimuladores de linfocitos T implicadas en la EC.^{7,8}

Las gliadinas son, sin duda, el principal componente tóxico del gluten, especialmente las α -gliadinas y las γ -gliadinas ya que la mayoría de las células T CD4+ específicas de DQ2 (o DQ8).⁹⁻¹¹ derivadas de biopsias del intestino delgado de pacientes celíacos parecen reconocer esta fracción. Durante los últimos años, en base a la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T, se han identificado epítomos inmunotóxicos en las proteínas del gluten de trigo y otras gramíneas. En el momento de redactar este capítulo, y sólo considerando el trigo harinero, se pueden encontrar en la base de datos de epítomos IEDB (<http://www.iedb.org/>) 190 epítomos estimuladores de linfocitos T relacionados con la EC. De ellos, 94 tienen su origen en moléculas de α -gliadinas, 74 en γ -gliadinas, 12 en ω -gliadinas, 8 en gluteninas LMW y 2 en gluteninas HMW. Por tanto, la fracción de gliadinas del gluten es, con diferencia, mayoritariamente responsable de la EC. Puesto que son los epítomos inmunogénicos los que inducen la respuesta autoinmune que da lugar a la EC, la toxicidad de cada una de las variantes de las proteínas del gluten vendrá determinada por el tipo y número de aquellos que contenga. Un péptido en particular, el 33-mer de α -gliadina (residuos 57-89), altamente resistente a la proteólisis, contiene 6 epítomos reconocidos por linfocitos T lo que le convierte en un contribuyente principal a la inmunotoxicidad del gluten.¹²

5. ¿Hay variedades de trigo no tóxicas?

El gluten confieren unas propiedades viscoelásticas únicas a la masa del trigo, de ahí la enorme variedad de alimentos que pueden fabricarse. El hombre, en el proceso de domesticación del trigo, ha ido seleccionando para este carácter y, en ningún momento se ha realizado una

selección genética teniendo en cuenta el carácter toxicidad en relación a la EC. Sin embargo, dentro del gluten, existe cierta variabilidad para el contenido relativo de cada una de las fracciones de prolaminas: gluteninas y gliadinas, tanto a nivel específico como dentro de la especie.¹³⁻¹⁵ Esta variabilidad justifica que en la base de datos de proteínas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) se pueden encontrar las secuencias de 129 α -gliadinas diferentes. Setenta y una de estas variantes han sido incorporadas durante el año 2012. Sobre esta base se están haciendo grandes esfuerzos por encontrar variantes no tóxicas o con baja toxicidad tanto en el trigo como en las especies silvestres relacionadas, rastreando la presencia de epítomos estimuladores de linfocitos T en las secuencias de genes de gliadinas de las distintas especies de trigo¹⁶ El análisis de las secuencias de genes de gliadinas ha puesto de manifiesto que el simple cambio en algunos aminoácidos de los péptidos tóxicos sería suficiente para que pierdan su carácter estimulador de los linfocitos T y, puesto que existen variantes naturales no tóxicas de estos péptidos,¹⁶ se ha sugerido la selección genética como herramienta para la obtención de variedades que contengan las variantes no tóxicas de los epítomos.¹⁷ Sin embargo, debido al estrecho ligamiento de los genes que se encuentran en ellos, la recombinación dentro de un *locus* es muy poco probable, y hasta la fecha parece poco factible que por cruzamiento y recombinación puedan obtenerse variedades de trigo no tóxicas. Estos estudios han permitido conocer también que las secuencias de prolaminas de *Aegilops tauschii*, donante de uno de los tres genomas del trigo harinero (el genoma D), son más ricas en epítomos inmunotóxicos que las de otras especies relacionadas.¹⁸ Ésta podría ser una de las razones por las que el trigo harinero es más tóxico que el trigo duro, que no posee el genoma D. Sin embargo, cuando se examina el contenido en gluten en variedades de trigo duro y harinero, aunque hay diferencias entre las variedades,¹⁹ estos valores están muy por encima del límite máximo permitido para celíacos (Figura 4). En consecuencia, la toxicidad de gluten ha pasado a ser más una cuestión cuantitativa que cualitativa y la solución está en aplicar las modernas técnicas biotecnológicas para el desarrollo de variedades de trigo menos tóxicas que puedan ser toleradas por los celíacos.

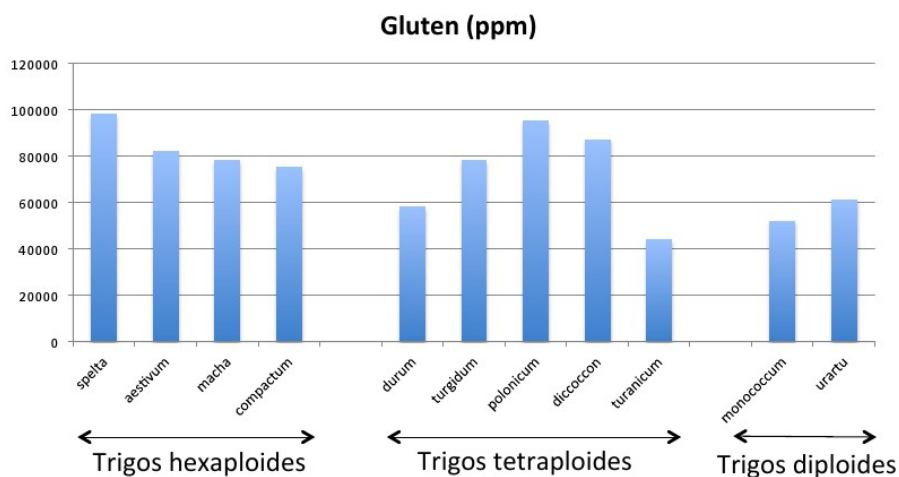


Figura 4. Contenido en gluten en genotipos de trigos hexaploides, tetraploides y diploides. El contenido en gluten se determinó mediante ensayos ELISA con el anticuerpo R5. Los valores indicados representan la media de siete líneas dentro de cada genotipo.

6. Desarrollo de variedades de trigo aptas para celíacos

El carácter bajo contenido en gluten tóxico es, como hemos visto, extremadamente complejo y su regulación genética insuficientemente conocida. Las técnicas biotecnológicas basadas en el silenciamiento específico de genes mediante ARN de interferencia (RNAi) es la alternativa mejor explorada hasta la fecha. Esta técnica consiste en un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes muy específico, por el que pequeñas moléculas de ARN complementarias a un ARN mensajero (ARNm) conducen a la degradación de éste, impidiendo así su traducción en proteínas.^{20,21} El descubrimiento de su mecanismo les valió a los investigadores Andrew Fire y Craig Mello la concesión del premio Nobel de medicina del año 2006, y ya apuntaron la potencialidad que la técnica tendría en medicina, ya que cualquier gen del que se sepa la secuencia puede ser la diana de un ARN interferente diseñado a medida y por tanto se puede apagar cesando el efecto adverso que tenga.

En principio la aproximación más directa es eliminar específicamente las gliadinas donde se han descrito epítomos tóxicos de forma que las nuevas variedades conserven sus propiedades de calidad panadera. La utilización de esta tecnología para el silenciamiento específico de las gliadinas en el grano de trigo implica un conocimiento muy preciso de la síntesis de este grupo de proteínas en el grano,²² y la utilización de promotores muy específicos,^{22,23} que funcionen solo en el grano, de forma que el fragmento de silenciamiento se encuentre sincronizado con la síntesis de las gliadinas que queremos silenciar. De este modo se han silenciado con éxito las α -gliadinas en la variedad "Florida"²⁴ y las γ -gliadinas en la variedad "Bobwhite (Figura 5).²⁵ Sin embargo, la reducción del contenido en grupos específicos de gliadinas no ha dado lugar a variedades con niveles de toxicidad que puedan ser consideradas aptas para los pacientes celíacos (Figura 5B). Una de las razones para explicar esta falta de reducción en los niveles de toxicidad puede ser la compensación que se produce en la síntesis de prolaminas,²⁶ de forma que la disminución de un grupo específico de gliadinas es compensada con proteínas de otro grupo de gliadinas, que también contienen epítomos tóxicos. No obstante, las variedades de trigo con niveles reducidos de distintas fracciones tóxicas podrían contribuir a reducir la carga de gluten para toda la población si se introducen como parentales en programas de mejora para la obtención de variedades "menos tóxicas" mediante cruzamiento, recombinación genética y selección de los genotipos que combinen ambos silenciamientos.

Para evitar este efecto compensatorio, y conseguir una disminución mucho más efectiva de la toxicidad en las nuevas variedades de trigo, la mejor alternativa es el uso de ARNs de interferencia quiméricos capaces de silenciar los genes de los tres grupos ω -, γ - y α -gliadinas. La construcción de un fragmento ARNi quimérico implica la identificación de zonas altamente conservadas en los genes de cada uno de los tres grupos de gliadinas y la combinación de dichas secuencias en un único fragmento de silenciamiento. El silenciamiento génico podría potenciarse utilizando el mismo fragmento de silenciamiento y una combinación de promotores, específicos de grano, pero con diferentes patrones de expresión. Esta estrategia permitiría que el fragmento de silenciamiento funcione durante etapas más prolongadas del desarrollo del grano.

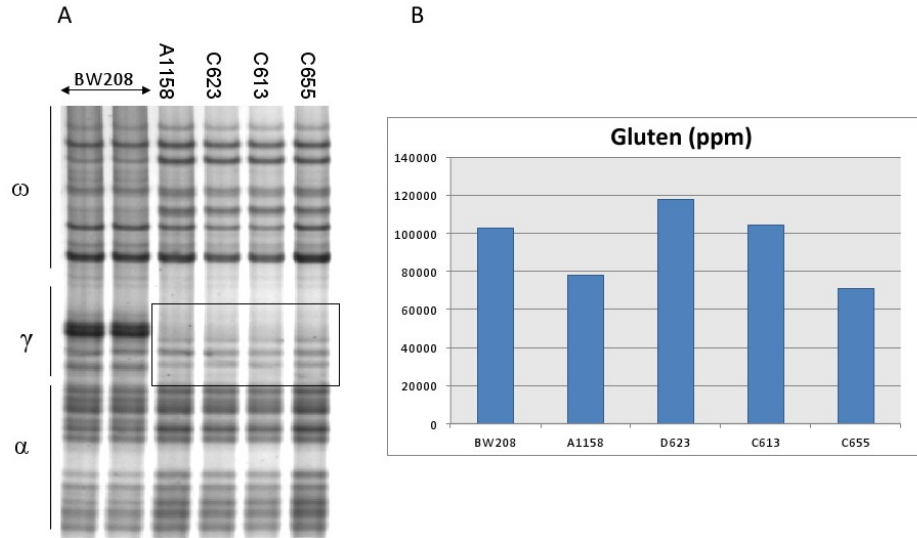
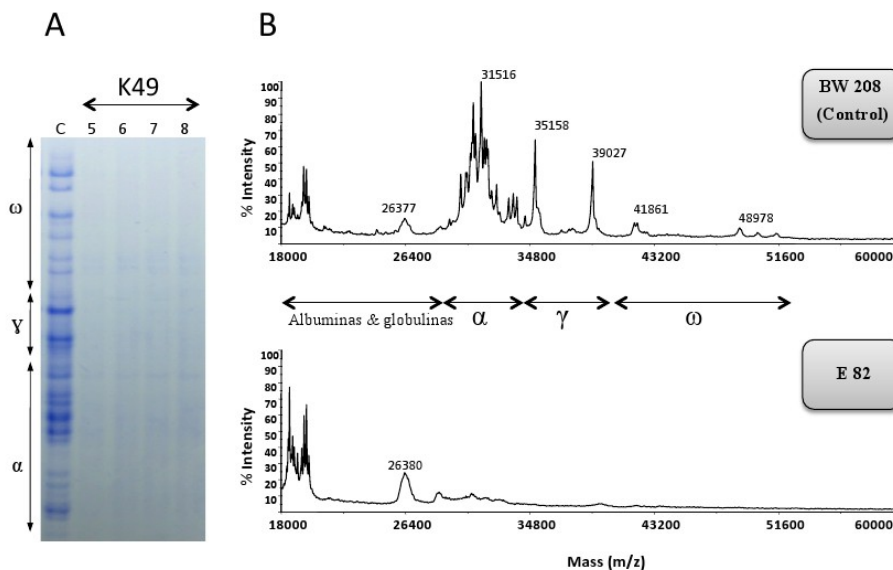


Figura 5. Silenciamiento específico de γ -gliadinas en el grano de trigo. A. La expresión del vector de silenciamiento es altamente específico y solo reduce las γ -gliadinas. B. Contenido en gluten, determinado mediante ELISA R5, de varias líneas con las γ -gliadinas silenciadas.

Con esta técnica hemos producido una colección de más de 50 líneas de trigo de diferentes variedades y por tanto con distintos patrones de gliadinas. Como se observa en la Figura 6A, el fragmento quimérico utilizado fue muy efectivo en el silenciamiento de los genes pertenecientes a los tres grupos de gliadinas. La utilización de diferentes promotores, aparentemente no mejora el efecto del silenciamiento, y los dos promotores utilizados fueron igualmente efectivos en el silenciamiento de las gliadinas.²⁷ Además, el fragmento RNAi quimérico fue igualmente muy efectivo en el silenciamiento de las gliadinas de diferentes variedades de trigo.²⁴ La especificidad del fragmento RNAi quimérico se muestra en la figura 6B, observándose silenciamiento en la fracción de gliadinas pero no en las albuminas y globulinas. Sin embargo, el silenciamiento específico de las gliadinas en el grano provoca un efecto compensatorio con otras proteínas como gluteninas^{27,28} y también con la fracción de albuminas y globulinas,²⁸ de forma que no hay grandes diferencias en el contenido total de proteína entre las líneas sin gliadinas y sus respectivos controles con gliadinas.²⁷ La cuantificación mediante ELISA sándwich con el anticuerpo R5 ha puesto de manifiesto que en algunas líneas, el porcentaje de gluten ha disminuido en torno al 98%. Esto datos se vieron corroborados con los ensayos con linfocitos T específicos de determinados epítomos altamente estimuladores. Los resultados de la cuantificación de la proliferación de linfocitos T específicas de los epítomos DQ2- α -II, DQ2- α -I, DQ2- γ -VII y DQ8- γ -I en respuesta al gluten procedente de las líneas silenciadas, y digerido con pepsina y tripsina, fueron realmente espectaculares.²⁷ Para algunas de estas líneas fueron necesarias cantidades de proteína cien veces mayores que las de sus respectivos controles para obtener una respuesta en la activación de linfocitos T que reconocen el epítomo DQ2- α -II²⁴ situado en el 33 mer, uno de los péptidos más inmunotóxicos que se conocen.¹³ La respuesta de los clones de linfocitos T específicos para otros epítomos (DQ2- γ -VII, DQ8- α -I, y DQ8- γ -I) localizados en γ - y α -gliadinas no superaron el nivel de detección para las concentraciones más

altas de los extractos proteicos evaluados.²⁷ Similares resultados se encontraron con clones de linfocitos T que reconocen epítomos altamente estimuladores presentes en las ω -gliadinas,²⁹ los cuales mostraron una respuesta proliferativa muy reducida en comparación con los controles con gliadinas.²⁷



C; línea control con gliadinas.

Figura 6. Silenciamiento de genes de los tres grupos de gliadinas mediante ARNi. A. Gel A-PAGE donde se muestra que la expresión de un ARNi quimérico que contiene secuencias altamente conservadas para los tres grupos de gliadinas provoca un silenciamiento efectivo de todas las gliadinas en el grano de trigo harinero. B. Espectrometría de masas MALDI-TOF donde se muestra que el silenciamiento es específico de gliadinas y otras fracciones como albuminas y globulinas no se reducen.

Las variedades de trigo descritas muestran muy reducidas las tres fracciones de gliadinas por lo que podrían ser aptas para otras patologías relacionadas con el gluten. Por ejemplo, la anafilaxis dependiente de ejercicio físico, que se produce en individuos sensibles después de practicar deporte, es disparada por genes codificados en el brazo corto del cromosoma 1B de trigo duro y harinero, las ω -5-gliadinas.^{30,31} En las líneas descritas, esta fracción proteica se encuentra altamente disminuida, por lo que estas harinas podría ser de ayuda para combatir esta grave patología. La sensibilidad al gluten, una nueva patología de intolerancia al gluten, que excluye la celiaquía y alergia, afecta al 6% de la población en USA,³² y cuyo tratamiento también es una dieta sin gluten, podría asimismo beneficiarse de las nuevas variedades descritas en este trabajo.

Un aspecto importante es conservar la calidad harino-panadera de las nuevas variedades sin gluten tóxico. Lo ideal es que puedan ser utilizadas ampliamente para la producción de pan y de otros productos alimenticios para celíacos y otras intolerancias al gluten y sus propiedades organolépticas sean lo más parecidas al pan elaborado con trigo normal.

Las subunidades de gluteninas HMW son funcionalmente muy importantes, ya que constituyen las principales determinantes de la elasticidad del gluten, propiedad que se correlaciona directamente con la calidad panadera de la harina. La calidad panadera de estas líneas se ha evaluado mediante la prueba de sedimentación SDS, ya que los volúmenes de sedimentación obtenidos están altamente correlacionados con la calidad panadera.³³ La mayoría de las líneas sin gliadinas mostraron unos valores de sedimentación SDS comparables a las líneas control, y solo cinco líneas tuvieron valores significativamente más bajos que las líneas control.²⁴ Sin embargo, los valores de sedimentación SDS de estas cinco líneas aún son comparables a los de trigos harineros de calidad media.

7. Conclusiones

Hasta la fecha los distintos estudios indican que todas las variedades de trigo cultivadas y las especies silvestres emparentadas son tóxicas, aunque con diferencias entre ellas, pero muy por encima del límite tolerado por los celíacos. El ARNi es una herramienta excelente para el silenciamiento específico de epítomos estimuladores de linfocitos T presentes en los tres grupos de gliadinas. Estos resultados suponen un importantísimo avance en la consecución de trigos aptos para la mayoría de los enfermos celíacos. Más aún, estas líneas podrían servir de bases para tratar otras patologías relacionadas con el gluten como son la anafilaxis dependiente de ejercicio físico y la sensibilidad al gluten no celíaco. El carácter “silenciamiento” puede ser transferido mediante cruzamiento a otras variedades de trigo permitiendo disponer de suficiente variabilidad genética para poder seleccionar líneas aún menos tóxicas que las ya producidas. En el caso de la toxicidad descrita en algunas gluteninas, especialmente las de alto peso molecular, fácilmente podrían seleccionarse variedades que porten alelos no tóxicos de las mismas, y que también pueden utilizarse como parentales en los programas de mejora.

Referencias

1. Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. *Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease.* Acta Paediatr. 1953; 42(1): 34-42. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.1953.tb05563.x>
2. FAOSTAT. Enero de 2013. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
3. Shewry PR, Halford NG. *Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization.* J Exp Bot. 2002; 53(370): 947-58. <http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>
4. Osborne TB. *The proteins of the wheat kernel.* Carnegie institution of Washington, 1907.
5. Shewry PR, Tatham AS, Forde J, Kreis M, Mifflin BJ. *The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment.* J Cereal Sci. 1986; 4(2): 97-106. [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210\(86\)80012-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80012-1)
6. Wieser H. *The precipitating factor in coeliac disease.* Baillière's Clin Gastroenterology. 1995; 9(2): 191-207. [http://dx.doi.org/10.1016/0950-3528\(95\)90027-6](http://dx.doi.org/10.1016/0950-3528(95)90027-6)
7. Wal Y van de, Kooy Y, Veelen P van, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, et al. *Cutting Edge: Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity.* J Immunol. 1998; 161(4): 1585-88.
8. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. *Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease.* Nat Med. 1998; 4(6): 713-17. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0698-713>
9. Lundin, KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, et al. *Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients.* J Exp Med. 1993; 178(1): 187-96. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.178.1.187>
10. Lundin KE, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. *T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8.* Hum Immunol. 1994; 41(4): 285-91. [http://dx.doi.org/10.1016/0198-8859\(94\)90047-7](http://dx.doi.org/10.1016/0198-8859(94)90047-7)
11. Arentz-Hansen H, Mcadam SN, Molberg Øyvind, Fleckenstein B, Lundin KEA, Jørgensen TJD, et al. *Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues.* Gastroenterology. 2002; 123(3): 803-9. <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2002.35381>
12. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. *Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue.* Science. 2002; 297(5590): 2275-9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1074129>
13. Wieser H. *Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types.* Eur Food Res Technol. 2000; 211(4): 262-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s002170000165>
14. Wieser H, Koehler P. *Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid?* Eur Food Res Technol. 2009; 229(1): 9-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-009-1020-5>
15. Žilić S, Barać M, Pešić M, Dodig D, Ignjatović-Mičić D. *Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes.* Int J Mol Sci. 2011; 12(9): 5878-94. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12095878>

16. Spaenij-Dekking L, Kooy-Winkelaar Y, Van Veelen P, Wouter Drijfhout J, Jonker H, Van Soest L, et al. *Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients*. *Gastroenterology*. 2005; 129(3): 797-806.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.017>
17. Mitea C, Salentijn EMJ, Van Veelen P, Goryunova SV, Van der Meer IM, Van den Broeck HC, et al. *A universal approach to eliminate antigenic properties of alpha-gliadin peptides in celiac disease*. *PLoS One*. 2010; 5(12).
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015637>
18. Xie Z, Wang C, Wang K, Wang S, Li X, Zhang Z, et al. *Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in α -gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.)*. *Theor Appl Genet*. 2010; 121(7): 1239-51.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00122-010-1384-8>
19. Molberg Ø, Uhlen AK, Jensen T, Flæte NS, Fleckenstein B, Arentz-Hansen H, et al. *Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: Implications for celiac disease*. *Gastroenterology*. 2005; 128(2): 393-401.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.11.003>
20. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-11. <http://dx.doi.org/10.1038/35888>
21. Mello CC, Conte D. *Revealing the world of RNA interference*. *Nature*. 2004; 431(7006): 338-42. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02872>
22. Pistón F, Marín S, Hernando A, Barro F. *Analysis of the activity of a γ -gliadin promoter in transgenic wheat and characterization of gliadin synthesis in wheat by MALDI-TOF during grain development*. *Mol Breed*. 2009; 23(4):655-67.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11032-009-9263-1>
23. Pistón F, León E, Lazzeri PA, Barro F. *Isolation of two storage protein promoters from *Hordeum chilense* and characterization of their expression patterns in transgenic wheat*. *Euphytica*. 2008; 162(3): 371-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-007-9530-3>
24. Osorio C, Wen N, Gemini R, Zemetra R, Wettstein D von, Rustgi S. *Targeted modification of wheat grain protein to reduce the content of celiac causing epitopes*. *Funct Integr Genomics*. 2012; 12(3): 417-38. <http://dx.doi.org/10.1007/s10142-012-0287-y>
25. Gil-Humanes J, Pistón F, Hernando A, Alvarez JB, Shewry PR, Barro F. *Silencing of γ -gliadins by RNA interference (RNAi) in bread wheat*. *J Cereal Sci*. 2008; 48(3): 565-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2008.03.005>
26. Pistón F, Gil-Humanes J, Rodríguez-Quijano M, Barro F. *Down-regulating γ -gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength*. *PLoS ONE*. 2011; 6(9): e24754.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024754>
27. Gil-Humanes J, Pistón F, Tollefsen S, Sollid LM, Barro F. *Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2010; 107(39): 17023-28.
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1007773107>
28. Gil-Humanes J, Pistón F, Shewry PR, Tosi P, Barro F. *Suppression of gliadins results in altered protein body morphology in wheat*. *J Exp Bot*. 2011; 62(12): 4203-13.
<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/err119>

29. Camarca A, Anderson RP, Mamone G, Fierro O, Facchiano A, Costantini S, et al. *Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease.* J Immunol. 2009; 182(7): 4158-66. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803181>
30. Morita E, Matsuo H, Chinuki Y, Takahashi H, Dahlström J, Tanaka A. *Food-dependent exercise-induced anaphylaxis -importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis-.* Allergol Int 2009; 58(4): 493-8. <http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.09-RAI-0125>
31. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H, et al. *A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis.* J Allergy Clin Immunol. 1999; 103(5): 912-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70438-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70438-0)
32. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, Rosa MD, et al. *Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity.* BMC Medicine. 2011; 9(1): 23. <http://dx.doi.org/10.1186/1741-7015-9-23>
33. Carter BP, Morris CF, Anderson JA. *Optimizing the SDS sedimentation test for end-use quality selection in a soft white and club wheat breeding program.* Cereal Chem. 1999; 76(6): 907-11. <http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.6.907>