



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Programa de doctorado

**Ingeniería Agraria, alimentaria, forestal y de desarrollo rural sostenible.**

TESIS DOCTORAL

**Caracterización de nuevas variantes alélicas de prolaminas en  
*Triticíneas*: potencial para la selección de variedades no tóxicas  
para celíacos**

Doctoranda

**Carmen Victoria Ozuna Serafini**

Director

**Francisco Barro Losada**

Febrero 2016

TITULO: *Caracterización de nuevas variantes alélicas de prolaminas en  
Triticíneas: potencial para la selección de variedades no tóxicas para  
celíacos*

AUTOR: *Carmen Victoria Ozuna Serafini*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** Caracterización de nuevas variantes alélicas de prolaminas en *Triticíneas*: potencial para la selección de variedades no tóxicas para celíacos

**DOCTORANDO/A:** Carmen Victoria Ozuna Serafini

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo presentado por Carmen Victoria Ozuna Serafini se ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Mejora Genética Vegetal del Instituto de Agricultura Sostenible (CSIC), el cual se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral.

Durante la realización de la tesis doctoral se han utilizado técnicas de Biología molecular e inmunológicas para obtener un trabajo de un extraordinario nivel científico, como queda de manifiesto en la publicación y en los dos trabajos científicos producidos.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 23 de diciembre de 2016

Firma del director

Fdo.: Francisco Barro Losada



**TÍTULO DE LA TESIS: Caracterización de nuevas variantes alélicas de prolaminas en *Triticíneas*: potencial para la selección de variedades no tóxicas para celíacos**

**DOCTORANDO/A: Carmen Victoria Ozuna Serafini.**

**ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

D. Jesún Valentín Jorrín Novo, Catedrático de Universidad de la Universidad de Córdoba, como responsable de la línea de investigación con título: “Bioquímica y Biotecnología Vegetal” informa que:

El trabajo titulado “Caracterización de nuevas variantes alélicas de prolaminas en *Triticíneas*: potencial para la selección de variedades no tóxicas para celíacos”, realizado por la doctoranda Carmen Victoria Ozuna Serafini, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Córdoba.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 22 de diciembre de 2016

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: Jesús Valentín Jorrín Novo



*Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo*

*Albert Einstein*

*Es mejor añadir vida a los días, en lugar de días a la vida*

*Rita Levi-Montalcini*

## **Agradecimientos**

Hay tantas personas a las que tengo algo que agradecer; personas que me apoyaron para empezar esta tesis y estuvieron allí todo el tiempo, personas que conocí en el camino y las que llegaron y se fueron.

En primer lugar agradezco a mi director de tesis Francisco Barro por creer en mí e invitarme a formar parte de su equipo, y por continuar creyendo cuando las cosas tardaban en salir. También le agradezco por impulsarme a sacar lo mejor de mí, aun cuando tenía ganas de tirar la toalla. He aprendido mucho de ti.

A mis compañeros de trabajo, María José, que está siempre dispuesta a resolver una duda y prestar su ayuda, a Ana Adela, que realiza un trabajo técnico fantástico. A las chicas, Susana, Miryam, Alba y Ana. A los que ya se fueron, Javi, Tadeo, Fernando, Paco, Fidel, Ricardo. Y por supuesto no podía faltar a mi querida Lola “*mi alboseña favorita*” con la que he compartido tanto!, dentro y fuera del lab, gracias mil por estar allí siempre, hasta cuando no tenían sentido mis ideas y bajarme a la tierra o subirme a las nubes. También a Carmen C., Cristina, Pilar P., y Sergio A. por las ayudas inter-laboratorio.

A Carolina Sousa de Sevilla, por abrirme las puertas de su laboratorio.

A Omar, Adam, Carlos y Liz mis compis y amigos de Horno de Porras (y en ocasiones Inma), por las cenas interminables, entre vinos, quesos, papitas con chorizo, mojo picón y papas arrugadas, hemos pasado veladas muy lindas.

A Rafa, por compartir la buena vida y brindarme su apoyo especialmente en la etapa final de la tesis, por enseñarme a apreciar otros autores aparte de los del mundo de la ciencia.

A mis amig@s Zulmis, siempre dispuesta a recibirme en Madrid, la Belenchi gran compi de viajes, Mariana por el parmesano, Thais por enseñarme a respirar, Rosa María siempre tan directa, David G “*el valenciano*” con esa gran pasión que pone en la investigación, Enri y Gracia (apoyo en el despacho), Alvaro L, Elena (de las melenas), Champy. Los de py, Beka, Fabo, Sergio, Diegui que a pesar de la distancia y el poco tiempo se me portaron! Y los del mundo Romi y Celi.



A Estefi, que ha sido como una hermana, fue la primera que me recibió con los brazos abiertos cuando no conocía a casi nadie en Córdoba, y posteriormente Angelinho, también al grupillo de aquel entonces: Eliana, Silvia, Rebeca, Javi, Rafa, Mercedes (hasta ahora). Las quedadas filosóficas con Jose “Pollo” y Juan Antonio “Torero”.

A mi madre, padre y hermanos que han estado siempre y continúan brindándome su apoyo incondicional. En especial a mi padre que le encantaba cuando le contaba sobre algún resultado, como te extraño papo querido. También a ambos por todo el cariño. Y a mis hermanos José y Santi, por cuestionarme constantemente sobre la investigación, eso me obligaba a encontrar una aplicabilidad.

A toda mi familia, especialmente Normi, la Porota, Lourdes (y el Sebis), Lauri, Ali, Didi, Lili, Alida, que cada vez que iba a mi otra casa, al otro lado del charco, siempre me esperaban con los brazos abiertos y dispuesto a mimarme, y darme mis pequeños gustos.

A todo este montón de personas y otras más fugaces, agradezco!, ya que todas han colaborado de una u otra forma a escribir en mi memoria muchas historias, algunas cortas y otras largas. Por creer en mí, por haberme regalado parte de sus tiempos, *Gracias Totales!!*

## Indice

<b>Capítulo 1</b> .....	1
Introducción y objetivos.....	1
<i>La domesticación y el cultivo de trigo</i> .....	3
<i>Las proteínas del gluten</i> .....	5
<i>Patologías relacionadas con trigo</i> .....	6
<i>Dieta libre de gluten</i> .....	9
<i>Desarrollo de líneas de Trigo con bajo contenido en gluten</i> .....	10
<i>Detección de gluten en los alimentos</i> .....	12
<i>Líneas de trigo con bajo contenido en gliadinas</i> .....	14
<b>Capítulo 2</b> .....	25
Diversification of the celiac disease $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization.....	25
<b>Capítulo 3</b> .....	33
Characterization of gluten proteins and celiac disease immunogenic epitopes in the <i>Triticeae</i> : cereal domestication and breeding contributed to decreased gliadin and prolamin .....	33
<b>Capítulo 4</b> .....	43
Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: an alternative to the gluten free diet with no long-term adverse effects.....	43
<b>Capítulo 5</b> .....	52
Conclusiones.....	52



# Capítulo 1

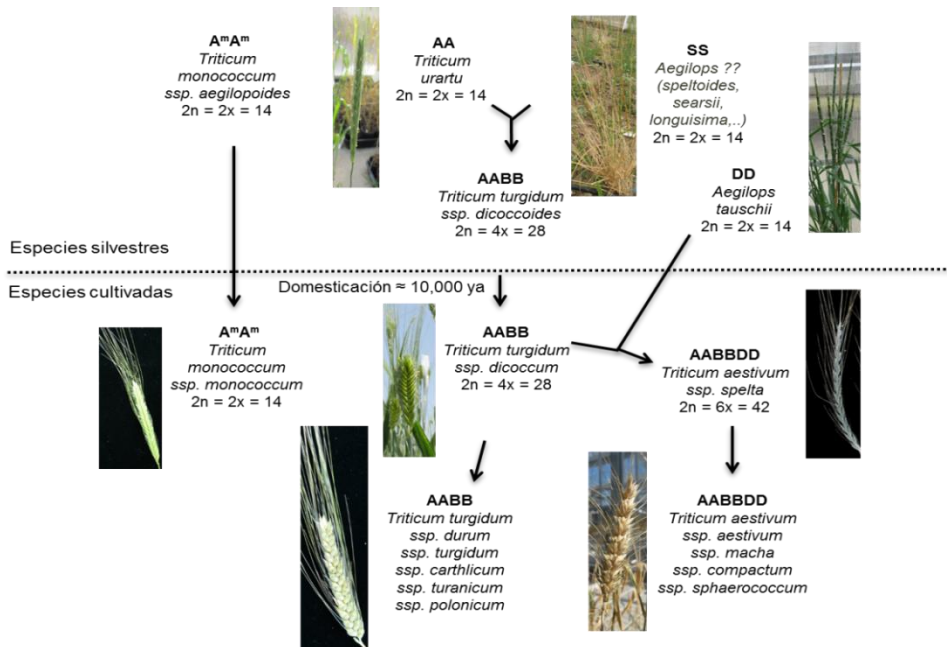
Introducción y objetivos



## Introducción

### La domesticación y el cultivo de trigo

El trigo es uno de los cultivos más importantes del mundo, con una producción anual de alrededor de 750 millones de toneladas (2014; <http://faostat3.fao.org/>), y en la actualidad se encuentra entre los tres grandes cultivos de cereales, junto al maíz y el arroz. El trigo harinero (*Triticum aestivum*, AABBDD,  $2n = 6x = 42$ ) es una especie alohexaploide que procede de la hibridación entre la escanda tetraploide (*T. turgidum* ssp. *dicoccum*, AABB,  $2n = 4x = 28$ ), y la especie diploide *Aegilops tauschii* (DD,  $2n = 2x = 14$ ) (Petersen *et al.*, 2006) (Figura 1). Por su parte, la escanda tetraploide se piensa que se ha originado de la hibridación entre los diploides *T. urartu* (AA) y, posiblemente *Ae. speltoides* (SS) (Petersen *et al.*, 2006). *T. urartu* está estrechamente relacionado con *T. monococcum* ya que ambos poseen el genoma AA, pero con notables diferencias entre ambos genomas, denotándose como AA y AmAm para *T. urartu* y *T. monococcum*, respectivamente. *T. monococcum* ssp. *monococcum* procede de la domesticación de la especie silvestre *T. monococcum* ssp. *aegilopoides* (Dubcovsky *et al.*, 1995).



**Figura 1.** Origen y evolución del trigo y especies relacionadas de *Aegilops*. Las especies silvestres que están por encima de la línea de puntos y por debajo las domesticadas. La ploidía y el número de cromosomas están indicados. La nomenclatura está de acuerdo a van Slageren (1994).

Un evento crucial en la historia de la humanidad fue el origen de la agricultura cerca de 10000 años atrás en el Neolítico, en Oriente Próximo. El trigo junto con la cebada son los cultivos importantes del Neolítico, domesticados junto con otros cereales y legumbres en el Creciente Fértil. La acumulación del exceso de comida y suministros permitieron el establecimiento de grandes asentamientos, resultando en la aparición de la civilización Occidental (Lev-Yadun *et al.*, 2000). *T. monococcum*, junto con *T. turgidum ssp. dicoccum* fueron los primeros trigos que cultivó el hombre (Dubcovsky and Dvorak, 2007). *T. monococcum* aún se cultiva en la actualidad, específicamente en zonas de montaña de ciertas áreas del Mediterráneo (Turquía, España, Marruecos, al sur de Italia y Francia, y países balcánicos) aunque el cultivo ha quedado reducido a zonas marginales, en los últimos años se han redescubierto estos cultivos olvidados (Alvarez and Guzmán, 2013; Hidalgo and Brandolini, 2014), como alternativas “saludables” al trigo harinero lo que podría resultar en un crecimiento en su cultivo para cubrir nichos de mercado muy específicos de alto valor en el futuro. El trigo hexaploide *T. aestivum ssp. aestivum*, se ha expandido mucho más que el trigo duro (*T. turgidum ssp. durum*). Actualmente el trigo harinero constituye la mayor parte de la cosecha mundial y se cultiva desde Noruega y Rusia a 65°N hasta Argentina a 45°S. Sin embargo, en regiones tropicales y subtropicales, el trigo está restringido a zonas con elevaciones altas (Lantican and Morris, 2005).

A pesar de su origen relativamente reciente el trigo harinero tiene una diversidad genética suficiente que ha permitido el desarrollo de cerca de 25000 variedades (Feldman, 1995), las cuales están adaptadas a un amplio rango de temperaturas en diferentes ambientes. No hay duda que la adaptabilidad del trigo hexaploide y sus altos rendimientos han contribuido a su éxito, pero esto solo no es suficiente para explicar el gran dominio que tiene sobre otros cultivos alrededor del mundo. La clave está en las propiedades únicas que tiene la masa hecha con harina de trigo, lo que permite su uso para la elaboración de varios tipos de panes y otros productos de confitería (tales como biscochos y galletas), pasta, fideos y otros productos procesados. Estas propiedades dependen de las estructuras e interacciones de las proteínas de reserva, que se conocen como proteínas del gluten (Shewry, 2009). El trigo, a pesar de su bajo contenido en proteínas (8-15 %) en comparación al almidón (65-80%), es una de las fuentes de proteínas más importantes para la dieta humana (Shewry, 2009).

## ***Las proteínas del gluten***

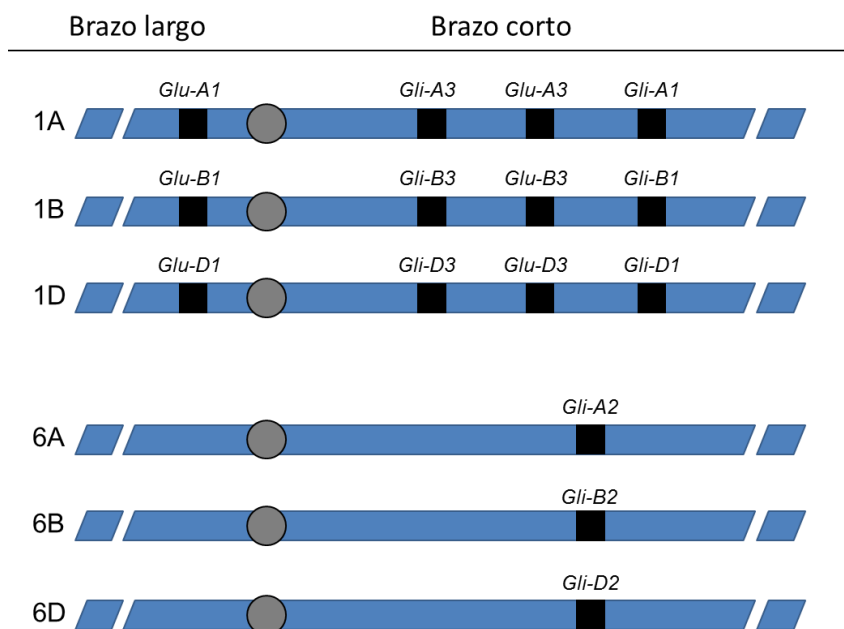
El gluten, es la fracción insoluble en agua de las proteínas de la harina de trigo, es responsable de la calidad harino-panadera y está compuesta principalmente por dos fracciones de prolaminas, que son las gliadinas y gluteninas. Las gliadinas a su vez se clasifican en tres tipos estructurales:  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas, de acuerdo a su movilidad electroforética en geles ácidos de poliacrilamida (A-PAGE); y las gluteninas se clasifican a su vez en gluteninas de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW, sus siglas en inglés) según su movilidad en geles básicos (SDS-PAGE). Estas proteínas también se denominan prolaminas, por su alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina. Aunque las proporciones entre ellas pueden variar, las prolaminas representan alrededor de un 80% del total de las proteínas del grano de trigo (Shewry, 2009). El resto de proteínas lo componen las albuminas y globulinas.

Las  $\alpha$ -gliadinas están codificadas por el loci *Gli-2* (*Gli-A2*, *Gli-B2* y *Gli-D2*) localizado en el brazo corto del grupo 6 de cromosomas homeólogos en trigo. Por su parte, las  $\omega$ - y  $\gamma$ -gliadinas están codificadas por genes agrupados en el loci *Gli-1* (*Gli-A1*, *Gli-B1* y *Gli-D1*) presentes en el brazo corto del grupo 1 de cromosomas homeólogos (Figura 2) (Payne, 1987). El loci *Gli-A3* y *Gli-B3*, presentes en los brazos cortos de los cromosomas homeólogos 1A y 1B, también codifican parte de las  $\omega$ -gliadinas (Dachkevitch *et al.*, 1993; Shewry *et al.*, 2003). Los genes de las gliadinas están estrechamente ligados y se heredan en bloque (Shewry *et al.*, 2003). Por su parte, los genes que codifican las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (HMW) se encuentran en los brazos largos de los cromosomas 1A, 1B y 1D (Payne, 1987), y los que codifican para las subunidades de gluteninas de bajo peso molecular (LMW) se encuentran en los loci *Glu-A3*, *Glu-B3* y *Glu-D3* localizados en el brazo corto del grupo 1 de cromosomas homeólogos (Figura 2) (Liu, 1995).

Se estima que el número de genes de las  $\alpha$ -gliadinas está entre 25 a 150 en trigo harinero (Anderson *et al.*, 1997), de  $\gamma$ -gliadinas entre 17 y 39 y de  $\omega$ -gliadinas entre 15 y 18 (Sabelli and Shewry, 1991). En cuanto a los genes de las HMW, en cada locus hay dos genes, que codifican una subunidad tipo x y tipo y, por tanto en trigo harinero podrían darse hasta seis genes, pero no todos se expresan (Shewry *et al.*,



1992). Aunque se han descrito 17 genes (Cassidy *et al.*, 1998) para las LMW, también hay otros que están estrechamente ligados a las  $\omega$ -gliadinas (Anderson *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Posición de los loci en los cromosomas implicados en la síntesis de proteínas de reserva (modificado de Payne, 1997)

### ***Patologías relacionadas con trigo.***

Se han descrito varias patologías relacionadas con las proteínas de trigo, que serían alergias e intolerancias. En cuanto a las alergias, tenemos alergia respiratoria y del tipo alimenticio, esta última producida por la ingesta de proteínas de trigo. Entre las alergias respiratorias está el Asma del panadero, que actualmente es una importante alergia ocupacional. Muchas proteínas de trigo han mostrado reactividad con las inmunoglobulinas (Ig)E del suero de estos pacientes. Sin embargo, las proteínas mayormente responsables de las alergias son las del tipo inhibidores de  $\alpha$ -amilasa (Salcedo *et al.*, 2011). Otro tipo de alergia es anafilaxia inducida por el ejercicio dependiente del trigo (WDEIA, sus siglas en inglés), que es un síndrome bien definido en el cual la ingestión de productos elaborados con trigo seguido de ejercicio físico puede resultar en una respuesta anafiláctica. Esta anafilaxis está asociada con las  $\omega$ -gliadinas, específicamente las  $\omega$ 5-gliadinas (Battais *et al.*, 2005).

En cuanto a las intolerancias, la ingesta de trigo, especialmente gluten, y en particular gliadinas, hay dos importantes patologías: (i) la enfermedad celíaca (EC), una enteropatía que consiste en una inflamación del intestino delgado y provoca una malabsorción de los nutrientes, inducida por la ingesta de proteínas de gluten de trigo o proteínas similares de cebada y centeno en individuos predispuestos genéticamente, con una prevalencia de alrededor del 0.7 al 2% en la población (Rewers, 2005), y (ii) la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC), una patología reconocida recientemente con una prevalencia estimada del 6% en la población de EEUU (Sapone *et al.*, 2011).

De estas patologías la mejor estudiada es la EC que presenta una etiología multifactorial compleja, con una fuerte componente ambiental (derivada de la ingesta del gluten) y también un fuerte componente genético ya que la mayoría de los celíacos presentan variantes del antígeno leucocitario humano (HLA)-DQ2 o el HLA-DQ8 (Sollid, 2002) capaces de reconocer los péptidos del gluten. El HLA-DQ2 es la versión que poseen la mayoría de los pacientes celíacos, con porcentaje de alrededor de más del 90%, está codificado por los genes *DQA1\*05* y *DQB1\*02* (Karell *et al.*, 2003). Las lesiones intestinales producidas en los celíacos, aparte de provocar malabsorción, también provocan una serie de complicaciones derivadas como son anemia, intolerancia a la lactosa, amenorrea, infertilidad, abortos repetidos, depresión, ansiedad, elevados niveles de enzimas hepáticas, entre otros (Green *et al.*, 2001). Sin embargo, la complicación más severa de la EC es la aparición de cáncer. Los adultos celíacos tienen el triple de probabilidad de padecer linfoma no Hodgkin que los individuos sanos (Catassi *et al.*, 2005). La formación de las lesiones en el intestino delgado se caracteriza por una inflamación crónica de la mucosa intestinal que puede resultar en atrofia de las vellosidades intestinales, malabsorción y toda una serie de manifestaciones clínicas. El desarrollo de la EC implica la activación de células T reactivas al gluten cuando los péptidos inmunoreactivos de este son reconocidos por las moléculas del HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

Por último la SGNC es más fácil definirla al descartar las patologías anteriores, ya que los pacientes manifiestan síntomas relacionados al consumo de trigo, pero éstos no corresponden a las alergias respiratorias ni a la EC. Los síntomas pueden variar ampliamente, incluyendo síntomas gastrointestinales, cansancio, dolor de cabeza, dermatitis, dolores musculares y articulares, depresión, ansiedad y anemia, y

no queda claro si SGNC representa un solo síndrome o una serie de condiciones (Sapone *et al.*, 2012). Además, el papel del gluten no se ha establecido claramente y los síntomas podrían relacionarse con otros componentes del trigo (Catassi *et al.* 2015). La patogénesis de la SGNC no se entiende muy bien, lo que dificulta el diagnóstico. Recientemente un grupo de expertos ha dado recomendaciones para el diagnóstico, que incluyen una dieta libre de gluten seguida de una estimulación con gluten, y si hay una variación del 30% o más en uno de los síntomas principales se considera un resultado positivo (Catassi *et al.* 2015). El trigo, junto con otros alimentos de origen vegetal, contienen pequeños carbohidratos fermentables, que se han denominado FODMAP (por sus siglas en inglés). Los FODMAPs fermentan en el colon, y están asociados al síndrome del intestino irritable. El bajo contenido de FODMAPs en productos sin gluten puede explicar las mejoras experimentadas por los pacientes con síndrome de intestino irritable y SGNC en dietas sin gluten (Muir and Gibson, 2013), lo cual complica aún más el diagnóstico de los pacientes con SGNC.

En el desarrollo de la EC, si bien existe un número de epítomos derivados de gluteninas (Molberg *et al.*, 2003), la mayoría de los péptidos inmunoreactivos proceden de gliadinas (Arentz-Hansen *et al.*, 2000a). Además mediante la acción de la enzima transglutaminasa 2 (TG2) que se encuentra en el intestino, la mayoría de los péptidos son más fácilmente reconocidos ya que esta enzima convierte los residuos de glutamina a glutamato, posiblemente la introducción de residuos cargados negativamente incrementa la afinidad de los péptidos por el HLA-DQ2 (Arentz-Hansen *et al.*, 2000b, Quarsten *et al.*, 1999).

Sobre las  $\alpha$ -gliadinas de trigo se han descrito numerosas epítomos relacionados con la EC. El 33-mer, presente es el péptido más inmunoreactivo en los pacientes celíacos, es resistente a la digestión por las proteasas intestinales, altamente reactivo frente a las células T aisladas de pacientes celíacos. Este péptido está presente en el N-terminal de la región repetitiva de las  $\alpha$ -gliadinas y contiene seis epítomos superpuestos con altas propiedades estimuladoras (Shan *et al.*, 2002). Las  $\alpha$ -gliadinas también contienen otro epítomo que solapa parcialmente con el 33-mer, el DQ2.5-glia- $\alpha$ 3 (Vader *et al.*, 2002). Además, en esta región también está el péptido p31-43 que ha sido relacionado con la respuesta inmune innata, necesaria para desencadenar la respuesta adaptativa de las células T (Maiuri *et al.*, 1996; Maiuri *et al.*, 2003). En la

región del C-terminal también encontramos otro epítipo reconocido por las moléculas HLA-DQ8 (DQ8-glia- $\alpha$ 1) (van de Wal *et al.*, 1998).

Aparte de los epítipos de las  $\alpha$ -gliadinas, las células T de los pacientes celíacos son inmunoreactivas a epítipos DQ2-hor-I y DQ2-sec-I de cebada y centeno, respectivamente (Tye-Din *et al.*, 2010). También han sido descritos epítipos inmunogénicos en las  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas de trigo, tales como DQ2.5-glia- $\gamma$ 1, que es el epítipo más inmunoreactivo encontrado en las  $\gamma$ -gliadinas y es reconocido por una tercera parte de los pacientes celíacos (Camarca *et al.*, 2009; Sjostrom *et al.*, 1998). Por su parte, los epítipos DQ2.5-glia- $\omega$ 1 y DQ2.5-glia- $\omega$ 2 de las  $\omega$ -gliadinas son reconocidos por las células T de la mayoría de los pacientes celíacos que han comido una mezcla de trigo, cebada y centeno (Tye-Din *et al.*, 2010).

Por otro lado, hay evidencias que las patologías relacionadas con el consumo de trigo han aumentado en los últimos años, con lo cual hay una preocupación importante de que se convierta en un problema de salud pública (Rubio-Tapia *et al.*, 2009). Este aumento en la prevalencia no se puede atribuir exclusivamente a la mejora en las técnicas de diagnóstico (Lohi *et al.*, 2007; Rubio-Tapia and Murray, 2010), y otros muchos son los factores que podrían estar contribuyendo al aumento de las patologías relacionadas con el consumo de trigo. Por ejemplo, hay un aumento en la demanda de trigo en nuevos mercados, especialmente en países en donde el trigo no se cultiva, lo cual está ligado a la adopción del “estilo de vida occidental” en esos países. Otros factores como la rápida implementación de procesos industriales en panadería, con tiempos de fermentación reducidos (Gobbetti *et al.*, 2007), la expansión de determinadas variedades de trigo que pudieran contener un gran número de péptidos inmunogénicos (Belderok, 2000) también han sido propuestos como posibles factores que colaboren al aumento de estas patologías.

### ***Dieta libre de gluten***

Consecuencia de este incremento en las patologías relacionadas con el gluten hay una mayor demanda de una dieta libre de gluten. Una dieta libre de gluten de por vida es el único tratamiento posible para la EC, lo cual implica una dificultad en primer lugar por el elevado coste de los productos sin gluten. Además, el gluten es un aditivo comúnmente utilizado en la industria alimenticia, y este se puede encontrar en

productos que no sospechamos que podrían contenerlo, tales como yogures, embutidos, chocolates, mermeladas, entre otros. Actualmente en la elaboración de alimentos libres de gluten se excluye el trigo, centeno, cebada, y en algunos países también la avena, que son sustituidos por harinas de otros cereales como el maíz, el arroz, o el almidón de patata. Sin embargo, los productos elaborados con harinas de maíz o arroz son mucho más caros y poseen unas características organolépticas muy diferentes de los elaborados con trigo. La situación ideal sería eliminar las proteínas tóxicas del gluten de trigo, cebada o centeno, de forma que conserven la parte del gluten que no es tóxica, y con ello poder elaborar pan, cerveza, y otros muchos productos que conserven parte del gluten y muchas de las propiedades organolépticas y funcionales asociadas. Esto es muy importante ya que una dieta totalmente exenta de gluten parece que no es del todo deseable para el enfermo celiaco. Se ha demostrado que una dieta exenta de gluten produce; en primer lugar, una disminución de la flora bacteriana beneficiosa como *Bifidobacterium*, *Clostridium lituseburense* y *Faecalibacterium prausnitzii* y por el contrario provoca incrementos notables en la poblaciones de *Enterobacteriaceae* y de *Escherichia coli* y, en segundo lugar, una disminución significativa de marcadores como TNF-alfa, interferón-gamma, IL-10 e IL-8 (Interleucina-10 y 8), todos ellos asociados con la capacidad de respuesta del sistema inmune (De Palma *et al.*, 2009), reducida en el enfermo celiaco.

Además, se ha encontrado que la dieta libre de gluten es pobre en fibra alimentaria debido a que se evitan los granos de los cereales antes mencionados, y estos productos con bajo contenido en fibra se hacen generalmente con almidones o harinas refinadas. También esta dieta es pobre en micronutrientes, particularmente la vitamina D, B12 y ácido fólico, y adicionalmente algunos minerales tales como hierro, zinc, magnesio y calcio. Particularmente se ha encontrado que los productos sin gluten tienen un exceso de grasas saturadas e hidrogenadas, al ser pobres en fibra contribuyen al aumento del índice glicémico y la carga glicémica del alimento (Vici *et al.* 2016).

### ***Desarrollo de líneas de Trigo con bajo contenido en gluten***

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo en encontrar y/o desarrollar líneas de trigos que naturalmente tengan un bajo contenido en gluten y en péptidos inmunoreactivos, de forma que se pudiera utilizar para la elaboración de alimentos

para las personas que padecen alguna patología relacionada con el gluten. Pero a la vez de tener un bajo contenido en gluten, la harina de estas líneas tienen que mantener buenas propiedades biomecánicas para que se puedan utilizar en la elaboración de productos alimenticios de calidad. Justamente éstas son las propiedades que aportan las proteínas del gluten a la harina de trigo. Por tanto lo ideal sería más bien un trigo con bajo contenido en péptidos inmunoreactivos y con un contenido en gluten aceptable para mantener las propiedades harino-panaderas.

Se han realizado varios estudios en cuanto a la distribución de los epítomos inmunoreactivos entre genomas, genotipos y especies. La especie *T. monococcum* ha sido bastante estudiada, ya que por tener solo el genoma AmAm, se consideraba que podría tener menos epítomos inmunoreactivos en la fracción del gluten. Evidencias recientes demuestran que el gluten de algunas líneas de *T. monococcum* provocan un reducido efecto inflamatorio en los pacientes celíacos (Gianfrani *et al.*, 2012; Pizzuti *et al.*, 2006), particularmente una de las líneas estudiadas por su ineficacia para activar la respuesta inmune innata (Gianfrani *et al.*, 2012). Otros estudios con pacientes celíacos demostraron que *T. monococcum* fue tóxico para algunos pacientes, aunque pudo ser tolerado por otra parte de los celíacos (Zanini *et al.*, 2015). Sin embargo (Suligoj *et al.*, 2013) vieron que al comparar la reactividad de *T. monococcum* con los trigos poliploides no había diferencias significativas entre ellos.

También se han hecho comparaciones entre trigos antiguos y modernos, y se ha visto que hay una gran variabilidad en cuanto a la toxicidad (van den Broeck *et al.*, 2010). Se analizaron líneas de trigo tetraploides, con el objeto de encontrar líneas con baja toxicidad (Colomba and Gregorini, 2012) o al menos con una toxicidad menor a la de los trigos hexaploides, ya que está descrito que muchos de los péptidos inmunoreactivos provienen del genoma DD de *Ae. tauschii* (Molberg *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2010), que está presente en los trigos hexaploides (*T. aestivum*). En cuanto a la comparación de trigos tetraploides entre sí, entre variedades antiguas y cultivares modernos, se vio que las variedades Graziella Ra y Kamut (antiguas) incluso son más inmunoreactivas que las variedades modernas, lo cual concuerda con que los trigos antiguos tienen un alto nivel de proteínas en comparación a los modernos (Gregorini *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha cuantificado la respuesta de células T frente

a diferentes cultivares de *T. turgidum ssp. dicoccum*, y se encontró que las prolaminas de todas las líneas estudiadas son reactivas (Vincentini *et al.*, 2009).

Por otro lado (van den Broeck *et al.*, 2009) han analizado diferentes líneas de trigo de la variedad Chinese Spring que contiene delecciones parciales del brazo corto de lo cromosomas 1 y 6, donde se encuentran los loci que codifican las gliadinas de trigo. Para ello usaron anticuerpos monoclonales que reconocen epítomos inmunoreactivos. La pérdida del brazo corto del cromosoma 6D resulta en una importante disminución de la reactividad debida a las  $\alpha$ -gliadinas, pero también un descenso en la funcionalidad de la masa. Otros caracteres tales como los parámetros reologicos también se ven afectados por estas delecciones.

Se han descrito (van Herpen *et al.*, 2006) genes de  $\alpha$ -gliadinas con diferentes juegos de péptidos inmunoreactivos, además se ha demostrado que varias sustituciones de aminoácidos eliminaban la actividad inmunoreactiva de dichos péptidos, especialmente las sustituciones de serina por prolina en sitios específicos de las  $\alpha$ -gliadinas, incluso llegando a eliminar la toxicidad (Mitea *et al.*, 2010), pero como los genes de las gliadinas, están estrechamente ligados y se heredan en bloque, por procesos de recombinación difícilmente se podrían seleccionar genes de gliadinas sin péptidos inmunoreactivos. Se han encontrado estos péptidos con las sustituciones anteriores de serina por prolina en las secuencias de algunas  $\alpha$ -gliadinas en trigos tetraploides, pero al cuantificar la reactividad con anticuerpos monoclonales del extracto de gliadinas, este continua teniendo una alta reactividad (Colomba and Gregorini 2012).

Con todos estos estudios y aproximaciones no se han encontrado líneas que naturalmente tengan un contenido muy bajo en gluten o epítomos inmunoreactivos, que puedan ser aptas para los celíacos. Es cierto que existen líneas de trigo que tienen menos gluten que otras, pero estas cantidades están muy por encima de lo que tolera un celíaco o un sensible al gluten.

### ***Detección de gluten en los alimentos***

Según el Codex, sólo los alimentos que no superen el nivel de 20 mg de gluten/kg pueden ser incluidos en una dieta sin gluten, y por tanto etiquetados como

“libres de gluten” (ALINORM08/31/26 2008). Este requisito establece el estándar para los métodos analíticos para la detección del gluten, ya que estos deben ser capaces de detectar trazas de gluten muy por debajo del umbral de 20 mg de gluten/kg. Entre los métodos para detectar o cuantificar el gluten en la harina de trigo y en diferentes preparaciones están los métodos inmunológicos, proteómicos y genómicos.

En la actualidad, los Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) basados en el anticuerpo monoclonal R5 es el método recomendado por el Codex (FAO/WHO 2015). Los ELISAs son comúnmente utilizados para el análisis de gluten, no sólo debido a su especificidad, sensibilidad e idoneidad para el análisis de rutina, sino también por falta de un método de referencia independiente (Gélinas and McKinnon, 2016).

En cuanto a los métodos proteómicos hay que destacar la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (con sus siglas en inglés “RP-HPLC”) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En el caso de las proteínas del gluten de trigo, estas se separan de acuerdo a las diferencias de hidrofobicidad y el orden de elución es el siguiente,  $\omega$ -,  $\alpha$ -, y  $\gamma$ -gliadinas, y para la fracción de las gluteninas pasan primero las HMW y luego las LMW (Wieser *et al.*, 1998). El análisis cuantitativo se lleva a cabo mediante la integración del área de cada pico individual presente en el cromatograma en la región de las  $\omega$ -,  $\alpha$ -, y  $\gamma$ -gliadinas, así como también para las HMW y las LMW (Piston *et al.*, 2011). Los métodos que combinan espectrometría de masas y cromatografía líquida (LC-MS/MS) son los enfoques no inmunológicos más prometedores para la cuantificación precisa de trazas de gluten (Scherf and Poms, 2016).

Los métodos genómicos no detectan las proteínas del gluten propiamente dichas, sino que el ADN o ARN indica la presencia de los epítomos inmunotóxicos del gluten. Entre ellos están las técnicas de secuenciación masiva, que es una herramienta útil para estudiar familias génicas y ha sido desarrollada para aumentar la sensibilidad del análisis de mutaciones (Altimari *et al.*, 2013). Usando la secuenciación 454 de nueva generación, cientos de amplicones de la misma secuencia (“reads”) son analizados en



paralelo (454.com). Con la secuenciación del ARN de  $\alpha$ -gliadinas de trigo duro se pudieron identificar epítomos inmunoreactivos presentes en esas líneas (Salentijn *et al.*, 2013). Cabe señalar que estas técnicas basadas en la detección de ADN o ARN no están relacionadas con la reactividad de la muestra ya que lo que dispara la reacción inmunológica son los péptidos presentes en la proteína, y no el ADN o ARN.

### ***Líneas de trigo con bajo contenido en gliadinas***

El desarrollo de nuevas variedades de cereales libres de gluten, con una buena calidad y excelentes propiedades organolépticas es una demanda cada vez más importante en el sector agroalimentario. El consumo de cereales en forma de pan, pasta y bollería en los países de la OECD es alto (AFSSA 2007, van Rossum *et al.*, 2011). Para el desarrollo de cereales libre de gluten, la técnica del ARN de interferencia es una herramienta muy efectiva, usada para silenciar grupos o familias de genes. Esta aproximación fue usada para reducir o silenciar el grupo de  $\alpha$ -gliadinas, con lo que se han obtenido dos líneas transgénicas con una reducción del 60% de estas proteínas en comparación con el trigo control (Becker *et al.*, 2012). Sin embargo, la reducción de las  $\alpha$ -gliadinas fue compensada con el aumento de las albuminas, globulinas, otras gliadinas y LMW, obteniéndose una reducción total del gluten en un 9%. Las  $\omega$ 5-gliadinas también han sido silenciadas mediante ARNi y transformación genética, con lo que se alteró la composición de la harina y se obtuvo un mejoramiento en la calidad del amasado. Estas líneas transgénicas podrían ser beneficiosas para pacientes con WDEIA, además pueden servir para producir harina de buena calidad y con una funcionalidad más consistente cuando se cultivan en diferentes lugares, ya que no se modifica la composición de proteínas por el factor ambiental (Altenbach and Allen, 2011, Altenbach *et al.*, 2014).

La técnica del ARNi también ha sido usada para silenciar el grupo de las  $\gamma$ -gliadinas (Piston *et al.*, 2011), y toda la familia de gliadinas, (Gil-Humanes *et al.*, 2010), con lo que se obtuvo un conjunto de líneas transgénicas con bajo contenido en gliadinas, que son excelentes candidatas para la producción de alimentos con un bajo contenido en gluten. Entre todas las líneas con bajo contenido en gliadinas generadas mediante el ARNi, la línea E82 es la más prometedora ya que es la que tiene menos epítomos inmunogénicos (Barro *et al.*, 2015), y el extracto de gluten fue incapaz de

activar a las células T reactivas a las  $\omega$ -gliadinas, y una reducida respuesta con las células T reactivas a los epítomos de las  $\alpha$ - y  $\gamma$ -gliadinas (Gil-Humanes *et al.*, 2010). Además, se ha visto que esta línea tiene unas propiedades sensoriales y una aceptación general, similar a los productos hechos con harina normal de trigo. Esta línea también tiene un aumento en el contenido de lisina significativamente mayor que las harinas normales (Gil-Humanes *et al.*, 2014). Por todas estas razones hemos escogido esta línea para realizar el ensayo de toxicidad en ratas, como paso previo al ensayo clínico con pacientes celíacos.

## Objetivos

- Caracterización génica del complejo inmunogénico vinculado al 33-mer de las  $\alpha$ -gliadinas en una colección de trigos y *Aegilops* mediante técnicas de secuenciación masiva de nueva generación y secuenciación tipo Sanger, para la identificación de líneas con bajo contenido en péptidos inmunogénicos.
- Evaluación y caracterización de la diversidad genética para proteínas de reserva en las *Triticíneas* de cara a la ampliación del acervo genético de los trigos cultivados, valorando su potencial para la selección de variedades no tóxicas para celíacos y su introgresión en variedades cultivadas para el desarrollo de materiales convencionales con alta calidad.
- Determinar el papel de la domesticación y la mejora genética en la evolución del contenido en proteínas de reserva, incluyendo gliadinas y sus fracciones y gluteninas y sus fracciones, y la frecuencia de epítomos inmunogénicos en las *Triticíneas*.
- Determinar la seguridad alimentaria de trigos transgénicos con muy bajo contenido en gliadinas.

## Referencias

- AFSSA** (2007) Summary of the Individual and National Study on Food Consumption 2 (INCA 2) 2006-2007.
- ALINORM08/31/26** (2008) Codex Alimentarius Commission , Appendix III. Rome, Italy: World Health Organization, WHO.
- Altenbach, S.B. and Allen, P.V.** (2011) Transformation of the US bread wheat 'Butte 86' and silencing of omega-5 gliadin genes. *GM crops*, **2**, 66-73.
- Altenbach, S.B., Tanaka, C.K. and Seabourn, B.W.** (2014) Silencing of omega-5 gliadins in transgenic wheat eliminates a major source of environmental variability and improves dough mixing properties of flour. *BMC plant biology*, **14**, 393.
- Altimari, A., de Biase, D., De Maglio, G., Gruppioni, E., Capizzi, E., Degiovanni, A., D'Errico, A., Pession, A., Pizzolitto, S., Fiorentino, M. and Tallini, G.** (2013) 454 next generation-sequencing outperforms allele-specific PCR, Sanger sequencing, and pyrosequencing for routine KRAS mutation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Oncotargets and therapy*, **6**, 1057-1064.
- Alvarez, J.B. and Guzmán, C.** (2013) Spanish Ancient Wheats: A Genetic Resource for Wheat Quality Breeding. *Adv Crop Sci Tech*, **1**, 1-7
- Anderson, O.D., Gu, Y.Q., Kong, X., Lazo, G.R. and Wu, J.** (2009) The wheat omega-gliadin genes: structure and EST analysis. *Functional & integrative genomics*, **9**, 397-410.
- Anderson, O.D., Litts, J.C. and Greene, F.C.** (1997) The a-gliadin gene family. I. Characterization of ten new wheat a-gliadin genomic clones, evidence for limited sequence conservation of flanking DNA, and Southern analysis of the gene family. *Theor Appl Genet*, **95**, 50-58.
- Arentz-Hansen, E.H., McAdam, S.N. and Molberg, Ø.K., C. Sollid, L. M.** (2000a) Production of a panel of recombinant gliadins for the characterisation of T cell reactivity in coeliac disease. *Gut*, **46**, 46-51.
- Arentz-Hansen, H., Korner, R., Molberg, Ø., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M.C., Lundin, K.E.A., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M. and McAdam, S.N.** (2000b) The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med*, **191**, 603-612.
- Barro, F., Iehisa, J.C.M., Gimenez, M.J., Garcia-Molina, M.D., Ozuna, C.V., Comino, I., Sousa, C. and Gil-Humanes, J.** (2015) Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines

- devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnol J*, 1-11.
- Battais, F., Mothes, T., Moneret-Vautrin, D.A., Pineau, F., Kanny, G., Popineau, Y., Bodinier, M. and Denery-Papini, S.** (2005) Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy*, **60**, 815-821.
- Becker, D., Wieser, H., Koehler, P., Folck, A., Mühling, K.H. and Zörb, C.** (2012) Protein composition and techno-functional properties of transgenic wheat with reduced  $\alpha$ -gliadin content obtained by RNA interference. *J Appl Bot Food Qual*, **85**, 23-33.
- Belderok, B.** (2000) Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr*, **55**, 1-14.
- Camarca, A., Anderson, R.P., Mamone, G., Fierro, O., Facchiano, A., Costantini, S., Zanzi, D., Sidney, J., Auricchio, S., Sette, A., Troncone, R. and Gianfrani, C.** (2009) Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease. *J Immunol*, **182**, 4158-4166.
- Cassidy, B.G., Dvorak, J. and Anderson, O.D.** (1998) The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor Appl Genet*, **96**, 743-750.
- Catassi, C., Bearzi, I. and Holmes, G.K.T.** (2005) Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. *Gastroenterology*, **128**, S79-S86.
- Catassi C, Elli L, Bonaz B, et al.** (2015) Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): the Salerno experts' criteria. *Nutrients*, **7**, 4966–77.
- Colomba, M.S. and Gregorini, A.** (2012) Are ancient durum wheats less toxic to celiac patients? A study of alpha-gliadin from Graziella Ra and Kamut. *Scientific World Journal*, **2012**, 837416.
- Dachkevitch, T., Redaelli, R., Biancardi, A. M., Metakovsky, E. V., and Pogna, N. E.** (1993). Genetics of gliadins coded by the group 1 chromosomes in the high quality bread wheat cultivar Neepawa. *Theor Appl Genet*. **86**, 389–399.
- De Palma, G., Nadal, I., Collado, M.C. and Sanz, Y.** (2009) Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr*, **102**, 1154-1160.
- Dubcovsky, J. and J., D.** (2007) Genome Plasticity a Key Factor in the Success of Polyploid Wheat Under Domestication. *Science*, **316**, 1809f-1809f.
- Dubcovsky, J., Luo, M.C., Zhon, G.Y., Bransteitter, R., Desai, A., Kilian, A., Kleinhofs, A. and Dvorak, J.** (1995) Genetic Map of Diploid Wheat, *Triticum monococcum* L., and Its Comparison With Maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics*, **143**, 983-999.

- FAO/WHO** (2015) Codex Committee of Methods of Analysis and Sampling MAS/36 CRD/15 . *Report on the 36th session in Budapest, Hungary, on 23e27 February 2015.*
- Feldman, M.** (1995) Wheats. Smartt J, Simmonds NW, eds. *Evolution of crop plants. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical*, 185-192.
- Gélinas, P. and McKinnon, C.** (2016) Gluten weight in ancient and modern wheat and the reactivity of epitopes towards R5 and G12 monoclonal antibodies. *Int J Food Sci Technol*, **51**, 1801-1810.
- Gianfrani, C., Maglio, M., Rotondi Aufiero, V., Camarca, A., Vocca, L., Iaquinto, G., Giardullo, N., Pogna, N., Troncone, R., Auricchio, S. and Mazzarella, G.** (2012) Immunogenicity of monococcum wheat in celiac patients. *Am J Clin Nutr*, **96**, 1339-1345.
- Gil-Humanes, J., Piston, F., Altamirano-Fortoul, R., Real, A., Comino, I., Sousa, C., Rosell, C.M. and Barro, F.** (2014) Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS one*, **9**, e90898.
- Gil-Humanes, J., Piston, F., Tollefsen, S., Sollid, L.M. and Barro, F.** (2010) Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **107**, 17023-17028.
- Gobbetti, M., Giuseppe Rizzello, C., Di Cagno, R. and De Angelis, M.** (2007) Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiol*, **24**, 187-196.
- Green, P.H.R., Stavropoulos, S.N., Panagi, S.G., Goldstein, S.L., McMahon, D.J., Absan, H. and Neugut, A.I.** (2001) Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. *Am J Gastroenterol* **96**, 126-131.
- Gregorini, A., Colomba, M., Ellis, H.J. and Ciclitira, P.J.** (2009) Immunogenicity characterization of two ancient wheat alpha-gliadin peptides related to coeliac disease. *Nutrients*, **1**, 276-290.
- Hidalgo, A. and Brandolini, A.** (2014) Nutritional properties of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.). *J Sci Food Agric*, **94**, 601-612.
- Karell, K., Louka, A.S., Moodie, S.J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., Ciclitira, P.J., Sollid, L.M. and Partanen, J.** (2003) HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the european genetics cluster on celiac disease. *Human immunology*, **64**, 469-477.
- Lantican, M.A.D., H. J. and Morris, M.L.** (2005) Impacts of International Wheat breeding research in the developing world, 1988-2002. *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo. CIMMYT.*

- Lev-Yadun, S., Gopher, A. and Abbo, S.** (2000) The Cradle of Agriculture. *Science*, **288**, 1602-1603.
- Liu, C.Y.** (1995) Identification of a new Mr glutenin subunit locus on chromosome 1B of durum wheat. *J Cereal Sci.*, **21**, 209-213.
- Lohi, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Laurila, K., Collin, P., Rissanen, H., Lohi, O., Bravi, E., Gasparin, M., Reunanen, A. and Maki, M.** (2007) Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther.* **26**, 1217-1225.
- Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S. and Londei, M.** (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *The Lancet*, **362**, 30-37.
- Maiuri, L., Picarelli, A., Boirivant, M., Coletta, S., Mazzilli, M.C., De Vincenzi, M., Londei, M. and Auricchio, S.** (1996) Definition of the Initial Immunologic Modifications Upon In Vitro Gliadin Challenge in the Small Intestine of Celiac Patients. *Gastroenterology*, **110**, 1368-1378.
- Mitea, C., Salentijn, E.M.J., P., v.V., V., G.S., van der Meer, I.M., C., v.d.B.H., R., M.J., Monserrat, V., Gilissen, L.J.W.J., Drijfhout, J.W., Dekking, L., Koning, F. and Smulders, M.J.M.** (2010) A Universal Approach to Eliminate Antigenic Properties of Alpha-Gliadin Peptides in Celiac Disease. *PloS one*, **5**, 1-9.
- Molberg, O., Solheim Flaete, N., Jensen, T., Lundin, K.E., Arentz-Hansen, H., Anderson, O.D., Kjersti Uhlen, A. and Sollid, L.M.** (2003) Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology*, **125**, 337-344.
- Molberg, Ø., Uhlen, A.K., Jensen, T., Flæte, N.S., Fleckenstein, B., Arentz-Hansen, H., Raki, M., Lundin, K.E.A. and Sollid, L.M.** (2005) Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: Implications for celiac disease. *Gastroenterology*, **128**, 393-401.
- Muir, J.G. and Gibson, P.R.** (2013) The low FODMAP diet for treatment of irritable bowel syndrome and other gastrointestinal disorders. *Gastroenterology and Hepatology*, **9**, 450-2.
- Payne, P.I.** (1987) Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann Rev Plant Physiol*, **38**, 141-153.
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M. and Berthelsen, K.** (2006) Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phylogenet Evol*, **39**, 70-82.

- Piston, F., Gil-Humanes, J., Rodriguez-Quijano, M. and Barro, F.** (2011) Down-regulating gamma-gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength. *PLoS one*, **6**, e24754.
- Pizzuti, D., Buda, A., D'Odorico, A., D'Inca, R., Chiarelli, S., Curioni, A. and Martines, D.** (2006) Lack of intestinal mucosal toxicity of Triticum monococcum in celiac disease patients. *Scandinavian J Gastroenterol*, **41**, 1305-1311.
- Quarsten, H., Molberg, O., Fugger, L., McAdam, S.N. and Sollid, L.M.** (1999) HLA binding and T cell recognition of a tissue transglutaminase-modified gliadin epitope. *European Journal of Immunology*, **29**, 2506-2514.
- Rewers, M.** (2005) Epidemiology of celiac disease: What are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterology*, **128**, S47-S51.
- Rubio-Tapia, A., Kyle, R.A., Kaplan, E.L., Johnson, D.R., Page, W., Erdtmann, F., Brantner, T.L., Kim, W.R., Phelps, T.K., Lahr, B.D., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J., 3rd and Murray, J.A.** (2009) Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*, **137**, 88-93.
- Rubio-Tapia, A. and Murray, J.A.** (2010) Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*. **26**, 116-122.
- Sabelli, P.A. and Shewry, P.R.** (1991) Characterization and organization of gene families at the Gli-1 loci of bread and durum wheats by restriction fragment analysis. *Theor Appl Genet*, **83**, 209-216.
- Salcedo, G., Quirce, S. and Diaz-Perales, A.** (2011) Wheat Allergens Associated With Baker's Asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*, **21**, 81-92.
- Salentijn, E.M.J., Esselink, D.G., Goryunova, S.V., van der Meer, I.M., Gilissen, L.J.W.J. and Smulders, M.J.M.** (2013) Quantitative and qualitative difference in celiac disease epitopes among durum wheat varieties identified through deep RNA-amplicon sequencing. *BMC genomics*, **14**, 905.
- Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P.H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D.S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D., Volta, U., Catassi, C. and Fasano, A.** (2012) Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*, **10**.
- Sapone, A., Lammers, K.M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M.T., De Rosa, M., Stefanile, R., Mazzarella, G., Tolone, C., Russo, M.I., Esposito, P., Ferraraccio, F., Carteni, M., Riegler, G., de Magistris, L. and Fasano, A.** (2011) Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med*, **9**, 23.



- Scherf, K.A. and Poms, R.E.** (2016) Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *J Cereal Sci.*, **67**, 112-122.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M. and Khosla, C.** (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, **297**, 2275-2279.
- Shewry, P.R.** (2009) Wheat. *Journal of experimental botany*, **60**, 1537-1553.
- Shewry, P.R., Halford, N.G. and Tatham, A.** (1992) High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J Cereal Sci.*, **15**, 105-120.
- Shewry, P.R., Halford, N.G. and Lafiandra, D.** (2003) The genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics*. **49**, 111-184
- Sjostrom, H., Lundin, K.E.A., Molberg, O., Korner, R., McAdam, S.N., Anthonsen, D., Quarsten, H., Noren, O., Roepstorff, P., Thorsby, E. and Sollid, L.M.** (1998) Identification of a Gliadin T-Cell Epitope in Coeliac Disease: General Importance of Gliadin Deamidation for Intestinal T-Cell Recognition. *Scand J Immunol*, **48**, 111-115.
- Sollid, L.M.** (2002) Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature rev. Immunology*, **2**, 647-655.
- Suligoj, T., Gregorini, A., Colomba, M., Ellis, H.J. and Ciclitira, P.J.** (2013) Evaluation of the safety of ancient strains of wheat in coeliac disease reveals heterogeneous small intestinal T cell responses suggestive of coeliac toxicity. *Clin Nutr*, **32**, 1043-1049.
- Tye-Din, J.A., Stewart, J.A., Dromey, J.A., Beissbarth, T., van Heel, D.A., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S.I., Gianfrani, C., Jewell, D.P., Hill, A.V., McCluskey, J., Rossjohn, J. and Anderson, R.P.** (2010) Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med*. **2**, 41ra51.
- Vader, W., Kooy, Y., van Veelen, P., de Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Peña, S., Mearin, L., Drijfhout, J.W. and Koning, F.** (2002) The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology*, **122**, 1729-1737.
- van de Wal, Y., Kooy, Y.M., van Veelen, P.A., Peña, S.A., Mearin, L.M., Molberg, O., Sollid, L.M., Mutis, T., Benckhuijsen, W., Drijfhout, J.W. and koning, F.** (1998) Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **95**, 10050-10054.
- van den Broeck, H.C., de Jong, H.C., Salentijn, E.M., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R.J., Gilissen, L.J., van der Meer, I.M. and Smulders, M.J.** (2010) Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding

- may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theor Appl Genet*, **121**, 1527-1539.
- van den Broeck, H.C., van Herpen, T.W., Schuit, C., Salentijn, E.M., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R.J., Smulders, M.J., Gilissen, L.J. and van der Meer, I.M.** (2009) Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC plant biology*, **9**, 41.
- van Herpen, T.W., Goryunova, S.V., van der Schoot, J., Mitreva, M., Salentijn, E., Vorst, O., Schenk, M.F., van Veelen, P.A., Koning, F., van Soest, L.J., Vosman, B., Bosch, D., Hamer, R.J., Gilissen, L.J. and Smulders, M.J.** (2006) Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC genomics*, **7**, 1.
- van Rossum, C.T.M., Fransen, H.P., Verkaik-Kloosterman, J., Buurma-Rethans, E.J.M. and Ocké, M.C.** (2011) Dutch National Food Consumption Survey 2007-2010.
- van Slageren, M. W.** (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (*Jaub. & Spach*) *Eig* (*Poaceae*); Wageningen Agriculture University: Wageningen (Netherlands).
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M. and Polzonetti, V.** (2016) Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin Nutr*, **35**, 1236-1241.
- Vincentini, O., Borrelli, O., Silano, M., Gazza, L., Pogna, N., Luchetti, R. and De Vincenzi, M.** (2009) T-cell response to different cultivars of farro wheat, *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*, in celiac disease patients. *Clin Nutr*, **28**, 272-277.
- Wieser, H., Antes, S. and Seilmeier, W.** (1998) Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem.*, **75**, 644-650.
- Xie, Z., Wang, C., Wang, K., Wang, S., Li, X., Zhang, Z., Ma, W. and Yan, Y.** (2010) Molecular characterization of the celiac disease epitope domains in alpha-gliadin genes in *Aegilops tauschii* and hexaploid wheats (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, **121**, 1239-1251.
- Zanini, B., Villanacci, V., De Leo, L. and Lanzini, A.** (2015) *Triticum monococcum* in patients with celiac disease: a phase II open study on safety of prolonged daily administration. *Eur J Nutr*.
- 454.com.** 454.com [homepage on the Internet]. 454 Life Sciences, a Roche Company; [http://454.com/downloads/GSJuniorSystem\\_Brochure.pdf](http://454.com/downloads/GSJuniorSystem_Brochure.pdf). Available from: <http://www.454.com/>. Accessed December 12, 2016.



## Capítulo 2

Diversification of the celiac disease  $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization

Publicado en/Published in:

---

**Ozuna, C.V., Iehisa, J.C.M., Giménez, M.J., Alvarez, J.B., Sousa, C., Barro, F.** (2015) Diversification of the celiac disease  $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. *Plant J.* 82, 794-805



# Diversification of the celiac disease $\alpha$ -gliadin complex in wheat: a 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization

Carmen V. Ozuna<sup>1,†</sup>, Julio C. M. Iehisa<sup>1,†,‡</sup>, María J. Giménez<sup>1</sup>, Juan B. Alvarez<sup>2</sup>, Carolina Sousa<sup>3</sup> and Francisco Barro<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Córdoba, E-14080 Spain,

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba, Córdoba, E-14071 Spain, and

<sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, 41012 Spain

Received 31 January 2015; revised 1 April 2015; accepted 2 April 2015; published online 10 April 2015.

\*For correspondence (email fbarro@ias.csic.es).

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

## SUMMARY

The gluten proteins from wheat, barley and rye are responsible both for celiac disease (CD) and for non-celiac gluten sensitivity, two pathologies affecting up to 6–8% of the human population worldwide. The wheat  $\alpha$ -gliadin proteins contain three major CD immunogenic peptides: p31–43, which induces the innate immune response; the 33-mer, formed by six overlapping copies of three highly stimulatory epitopes; and an additional DQ2.5-glia- $\alpha$ 3 epitope which partially overlaps with the 33-mer. Next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing of  $\alpha$ -gliadin genes from diploid and polyploid wheat provided six types of  $\alpha$ -gliadins (named 1–6) with strong differences in their frequencies in diploid and polyploid wheat, and in the presence and abundance of these CD immunogenic peptides. Immunogenic variants of the p31–43 peptide were found in most of the  $\alpha$ -gliadins. Variants of the DQ2.5-glia- $\alpha$ 3 epitope were associated with specific types of  $\alpha$ -gliadins. Remarkably, only type 1  $\alpha$ -gliadins contained 33-mer epitopes. Moreover, the full immunodominant 33-mer fragment was only present in hexaploid wheat at low abundance, probably as the result of allohexaploidization events from subtype 1.2  $\alpha$ -gliadins found only in *Aegilops tauschii*, the D-genome donor of hexaploid wheat. Type 3  $\alpha$ -gliadins seem to be the ancestral type as they are found in most of the  $\alpha$ -gliadin-expressing Triticeae species. These findings are important for reducing the incidence of CD by the breeding/selection of wheat varieties with low stimulatory capacity of T cells. Moreover, advanced genome-editing techniques (TALENs, CRISPR) will be easier to implement on the small group of  $\alpha$ -gliadins containing only immunogenic peptides.

**Keywords:** alpha-gliadin, wheat, celiac disease, 33-mer peptide.

## INTRODUCTION

Wheat is one of the most important crops in the world, with an annual production of about 715 million tons (2013; <http://faostat3.fao.org/>). Bread wheat (*Triticum aestivum*,  $2n = 6x = 42$ ; genomic code BBAADD) is an allohexaploid species that arose by natural hybridization between emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*,  $2n = 4x = 28$ , BBAA), and the diploid *Aegilops tauschii* ( $2n = 2x = 14$ , DD) (Petersen *et al.*, 2006). In turn, tetraploid emmer wheat is hypothesized to have originated through hybridization between the diploids *T. urartu* (AA) and, possibly, *Ae. speltooides* (SS) (Petersen *et al.*, 2006).

Despite its relatively low protein content (8–15%), wheat is the most important protein source in the human diet. Gluten, the water insoluble fraction of wheat flour protein, is responsible for the bread-making quality of wheat and is mainly composed of two prolamin fractions, called gliadins ( $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\omega$ ) and glutenins (Shewry, 2009). The ingestion of these proteins is responsible for two important pathologies: (i) celiac disease (CD), a food-sensitive enteropathy with a prevalence of about 0.7–2% in the human population, in genetically predisposed individuals (Rewers, 2005); and (ii) gluten sensitivity, a newly-recognized pathology

## Resumen

Las proteínas del gluten de trigo, cebada y centeno son responsables de la enfermedad celiaca (EC) y la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC), dos patologías que afectan hasta el 6-8% de la población a nivel mundial. Las proteínas  $\alpha$ -gliadinas de trigo contienen los tres principales péptidos inmunogénicos de la EC: el p31-43, que induce la respuesta inmune innata; el 33-mer, formado por seis epítomos solapantes altamente reactivos; y el DQ2.5-glia- $\alpha$ 3 un epítomo adicional que solapa parcialmente con el 33-mer. La secuenciación masiva y la secuenciación sanger de los genes de  $\alpha$ -gliadinas de trigos diploides y poliploides proporcionaron seis tipos de  $\alpha$ -gliadinas (nombradas 1-6) con grandes diferencias en sus frecuencias en los trigos diploides y poliploides, así como también en la presencia y abundancia de estos péptidos inmunogénicos de la EC. Las variantes inmunogénicas del péptido p31-43 se han encontrado en la mayoría de las  $\alpha$ -gliadinas. Las variantes del epítomo DQ2.5-glia- $\alpha$ 3 fueron asociadas con tipos específicos de  $\alpha$ -gliadinas. Es de destacar que solo el tipo 1 de  $\alpha$ -gliadinas contiene los epítomos del 33-mer. Además, el fragmento completo del 33-mer solo estuvo presente en los trigos hexaploides, con una abundancia baja, probablemente como resultado de los eventos de alohexaploidización del subtipo 1.2 de  $\alpha$ -gliadinas encontrada únicamente en *Aegilops tauschii*, que es el donador del genoma D de los trigos hexaploides. El tipo 3 de  $\alpha$ -gliadinas parece ser el tipo ancestral ya que fueron encontradas en la mayoría de las  $\alpha$ -gliadinas expresadas en las especies de Triticea. Estos resultados son importantes para reducir la incidencia de la EC mediante la selección de variedades de trigos con baja capacidad estimuladora de células T. Además, las técnicas avanzadas de edición de genoma (TALENs, CRISPR) serán más fáciles de implementar en un pequeño grupo de  $\alpha$ -gliadinas que contienen los péptidos más inmunogénicos.

**Palabras clave:** alfa-gliadinas, trigo, enfermedad celiaca, péptido 33-mer.

Wheat is one of the most important crops in the world. Despite its relatively low protein content (8-15%), wheat is the most important protein source in the human diet. Gluten, is responsible for the breadmaking quality of wheat and is mainly composed of prolamins fractions, gliadins ( $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\omega$ ) and glutenins (Shewry, 2009). The ingestion of these proteins is responsible for two important pathologies, i) celiac disease (CD), a food-sensitive enteropathy with a prevalence of about 0.7%-2% in the human population, in genetically predisposed individuals (Rewers, 2005), and ii) gluten sensitivity, a newly-recognized pathology with an estimated prevalence of 6% in the USA population (Sapone *et al.*, 2011).

The  $\alpha$ -gliadin 33-mer is one of the digestion-resistant gluten peptides that is highly reactive to isolated celiac T cells and is the main immunodominant toxic peptide in celiac patients. This peptide is present in the N-terminal repetitive region of  $\alpha$ -gliadins and contains six overlapping copies of three different DQ2-restricted T-cell epitopes (Shan *et al.*, 2002).  $\alpha$ -gliadins also contain an additional DQ2-restricted epitope which partially overlaps with 33-mer peptide (Vader *et al.*, 2002). Moreover, the peptide p31-43 of these  $\alpha$ -gliadins has been reported to induce the innate immune response necessary to initiate the T-cell adaptive response (Maiuri *et al.*, 1996; Maiuri *et al.*, 2003).

In this work a comprehensive study combining NGS genomic-amplicon sequencing and Sanger sequencing of the entire fragment of  $\alpha$ -gliadins containing immunogenic epitopes has been carried out in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. We identify six different types of  $\alpha$ -gliadins but only one type contains all the immunogenic peptides and epitopes, and the five other types of  $\alpha$ -gliadins do not contain epitopes for the 33-mer peptide. We subjected the genome of domesticated and wild wheat and relatives, including 96 accessions of *Triticum* and *Aegilops* species, to amplicon NGS.

From the alignment of consensus sequences obtained by clustering, six Types of  $\alpha$ -gliadin sequences (named 1 to 6) were identified which varied mainly in the pattern and number of repeats in the region corresponding to the 33-mer, although some variants differed in regions other than 33-mer. Type 1  $\alpha$ -gliadins also predominated in tetraploid and hexaploid wheats, followed by Type 6 sequences. These trends were



also observed in pseudogenes, except in *Ae. longissima*, *Ae. tauschii*, *T. monococcum* and *T. spelta*. In general, similar results were obtained from Sanger sequencing.

The Type 1  $\alpha$ -gliadins can be divided in subtypes according to the number of P(F/Y)PQPQL repeat units present in the region of 33-mer, ranging from one to four. Subtype 1.1 was found in almost all accessions analyzed and was the predominant class in most. The Subtype with three repeat units is equivalent to the complete 33-mer peptide and contained six epitopes. Although the variant 1.3-6, or 33-mer peptide, was found only in hexaploid wheat at lower frequency, and it was not detected in 10 hexaploid lines.

We analyzed the variants of DQ2.5-glia- $\alpha$ 3 epitope. Three major variants of this epitope were identified and named FR-, FP-, and FS-type according to the first two amino acids of their sequences. Two major variants of the peptide p31-43 (LG-, and LP-type), associated with the innate immune response induced by gluten, were found in all diploid and polyploidy species analyzed. Almost all of the Type 1  $\alpha$ -gliadins in diploids with the A genome and tetraploid wheats were found to be associated with the LG-type p31-43 peptide, and in *Aegilops* species with the PG-type.

Based on the abundance of CD epitope variants and the abundance of Type 1  $\alpha$ -gliadins with different number of epitopes, we selected putative “reduced toxicity” accessions. Besides diploids with the S genome, two hexaploid and seven tetraploid wheats were selected.

To study the origin of different  $\alpha$ -gliadin types in wheat, phylogenetic analysis was performed including the  $\alpha$ -gliadin sequences available in the NCBI nucleotide database. Type 3  $\alpha$ -gliadins predominated in many other *Triticeae* species, which may indicate that this is the ancestral  $\alpha$ -gliadin type. Phylogenetic analysis of the N-terminal region of  $\alpha$ -gliadins, indicated that Type 3  $\alpha$ -gliadins are more closely related to Type 2 than to Type 1.

In this work six types of  $\alpha$ -gliadins were identified in diploid and polyploid wheats but only one contains all the immunogenic peptides and epitopes, and five types of  $\alpha$ -gliadins that do not contain epitopes for the 33-mer, which is the most immunogenic peptide described so far. These findings are important for reducing the incidence of CD by the breeding/selection of wheat varieties containing  $\alpha$ -gliadins

with low stimulatory capacity of T-cells. Moreover, advanced genome-editing techniques (TALENs, CRISPR) will be easier to implement on the small group of  $\alpha$ -gliadins containing only the most immunogenic Subtypes of  $\alpha$ -gliadins.

### **Acknowledgements**

The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project AGL2013-48946-C3-1-R), the European Regional Development Fund (FEDER), and Junta de Andalucía (Project P11-AGR-7920) supported this work. The technical assistance of Ana García is acknowledged.

## References

- Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S. and Londei, M.** (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *The Lancet*, **362**, 30-37.
- Maiuri, L., Picarelli, A., Boirivant, M., Coletta, S., Mazzilli, M.C., De Vincenzi, M., Londei, M. and Auricchio, S.** (1996) Definition of the Initial Immunologic Modifications Upon In Vitro Gliadin Challenge in the Small Intestine of Celiac Patients. *Gastroenterol*, **110**, 1368-1378.
- Rewers, M.** (2005) Epidemiology of celiac disease: What are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterol*, **128**, S47-S51.
- Sapone, A., Lammers, K.M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M.T., De Rosa, M., Stefanile, R., Mazzarella, G., Tolone, C., Russo, M.I., Esposito, P., Ferraraccio, F., Carteni, M., Riegler, G., de Magistris, L. and Fasano, A.** (2011) Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med*, **9**, 23.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M. and Khosla, C.** (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, **297**, 2275-2279.
- Shewry, P.R.** (2009) Wheat. *Journal of experimental botany*, **60**, 1537-1553.
- Vader, W., Kooy, Y., van Veelen, P., de Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Peña, S., Mearin, L., Drijfhout, J.W. and Koning, F.** (2002) The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterol*, **122**, 1729-1737.



## Capítulo 3

Characterization of gluten proteins and celiac disease immunogenic epitopes in the *Triticeae*: cereal domestication and breeding contributed to decreased gliadin and prolamin

Enviado a:/ Submitted to:

---

**Ozuna, C.V., Barro, F.** (2017) Characterization of gluten proteins and celiac disease immunogenic epitopes in the *Triticeae*: cereal domestication and breeding contributed to decreased gliadin and prolamin. *Theor Appl Genet* (Submitted)



## Resumen

Las proteínas del trigo son muy importantes para la dieta humana, de estas proteínas el gluten es la más abundante, y es responsable por desencadenar la enfermedad celiaca (EC) y la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) en individuos susceptibles. La EC es la mejor estudiada y hay una preocupación a nivel mundial para entender su aumento, una hipótesis es el aumento del gluten y la toxicidad en los trigos cultivados. Nuestro objetivo fue determinar si efectivamente eso pasa con las especies cultivadas. Para determinar el contenido de gluten se usó la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y para estimar la toxicidad hemos realizado una búsqueda de epítomos tóxicos en las secuencias de gliadinas de Triticineas reportadas en la base de datos del NCBI. Hemos observado una tendencia de un bajo contenido de gliadinas en al especies cultivadas al compararlas con sus respectivos ancestros silvestres en todos los miembros de la tribu de las Triticineas estudiadas. Respecto a las subunidades de gluteninas, no hay una tendencia clara. Luego, el peso de mil granos es mayor para las especies domesticadas. La cuantificación de los epítomos reconocidos DQ2 y DQ8, encontrados en todas las secuencias de gliadinas, mostraron una gran variabilidad en el número de epítomos de la EC por especie y por genoma, los genomas con más epítomos fueron el DD y el AABBDD, y consecuentemente las especies con más epítomos fueron *Ae. tauschii* y *T. aestivum*. En conclusión, con la domesticación no se aumentó el contenido de gluten en las especies de Triticineas estudiadas aquí, y con la mejora genética el contenido ha disminuido. El trigo duro es el que tiene el contenido más bajo de gluten y de epítomos inmunogénicos para los celíacos. La cebada cultivada podría ser un cereal alternativo con pocos epítomos inmunogénicos y bajo contenido en gluten, pero no es apto para los celíacos.

**Palabras clave:** gliadinas, gluten, RP-HPLC, trigo, enfermedad celiaca.

**Enviado a:** Revista *Theor Appl Genet*. Este artículo está bajo revision en *Theor Appl Genet*. Debido a problemas de derecho de autor, los resultados de este artículo no pueden incluirse en esta versión online. Está incluido el resumen.

**Abstract**

Wheat proteins are very important for human diet, of which gluten is the most abundant, and is responsible for triggering celiac disease (CD) and non celiac gluten sensitivity (NCGS) in susceptible individuals. CD is the better studied and there is a global concern in understanding its rise, one hypothesis that arises is the increased gluten and toxicity in cultivated wheat. Our objective was to determine if effectively it happens in the cultivated species. To measure the gluten we used the reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and to estimate the toxicity we made a search of toxic epitopes in the gliadin sequences of Triticeae reports in the NCBI database. We have observed a tendency of lower content of gliadin in the cultivated species compared with their respective wild ancestor in all members of Triticeae tribe studied here. Regarding the glutenin subunits, there is not a clear tendency. Then, thousand kernel weight is higher for domesticated species. Quantification of DQ2 and -DQ8 restricted epitopes, found in all gliadin sequences, showed a great variability in the number of CD epitopes per species and genome, the genome with more epitopes are DD and AABBDD, and consequently the species with more epitopes are *Ae. tauschii* and *T. aestivum*. In conclusion, with domestication did not increase the gluten in Triticeae species studied here, and with the breeding the content was decreased. Durum wheats are the ones with lower content of gluten and immunogenic epitopes for celiac. Cultivate barley could be an alternative cereal with low immunogenic epitopes and low gluten, but not safe for celiacs.

**Keywords:** gliadins, gluten, RP-HPLC, wheat, celiac disease.

**Submitted to:** Journal *Theor Appl Genet*. This article is under review in *TheorAppl Genet*. Due to Copyright problems, the results of this article cannot be included in this online version. It includes the abstract.



Wheat is an important protein source for the human diet, despite its relatively low content (8-15%) in comparison to starch (65-80%). The protein content of wheat varies widely and a third of this variation is attributed to genotype (Shewry *et al.* 2013). It is also known that the gluten content varies among Triticeae (Wieser, 2000). Gluten proteins, also called prolamins, are responsible for the breadmaking quality of wheat and they are mainly composed of two prolamins fractions, gliadins and glutenin (Shewry 2009). Similar proteins are also present in other cereals; in rye secalins, and in barley hordeins (Tatham and Shewry 2012). In wheat, the gliadin fraction can be divided into three structural types:  $\alpha$ -,  $\omega$ - and  $\gamma$ -, whereas the glutenins comprise the high molecular weight (HMW) and the low molecular weight (LMW) glutenin subunits (Shewry and Halford 2002).

Despite its role in the functionality of wheat, gluten is important for human health as the ingestion of gluten proteins is related with two important pathologies: (i) celiac disease (CD), a food-sensitive enteropathy that it develops in genetically predisposed individuals (Rewers 2005); and (ii) non-celiac gluten sensitivity (NCGS), a newly-recognized pathology (Sapone *et al.* 2011). Most of CD reactive epitopes have been found in the gliadin fraction (Arentz–Hansen *et al.* 2002).

On the other hand, there are evidences that gluten related disorders have been increased in the recent years (Rubio-Tapia *et al.* 2009). This increase cannot be attributed to the improve in the diagnostic (Lohi *et al.* 2007, Rubio-Tapia and Murray 2010), and many factors could be contributing. Factors like industrial bakery with reduce time of fermentation (Gobbetti *et al.* 2007), the influences of the United States and Canada in wheat trading, and the spreading of modern wheat varieties with higher amount of toxic gluten (Belderok 2000) has been proposed.

In the present work we have studied the content of the gluten proteins in the tribe Triticeae, including cultivated and wild ancestors of durum and bread wheat, and rye and barley. An ‘in silico’ proteomic approach was also carried out to determine the composition and abundance of major CD related epitopes in the tribe Triticeae. We were used 246 accessions from the Triticeae tribe. To measure the gluten content we have used the reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Gliadins and glutenins were extracted from wheat flour. The weight (g) of thousand

seeds was determined to 1000 seed from each sample. Epitopes restricted by HLA-DQ molecules (Sollid *et al.* 2012) were searched on 954 full protein sequences present in the NCBI database, which included  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -gliadins from *Triticum* and *Aegilops*, and homologous proteins from barley and rye.

#### *Gluten proteins distribution in the Triticeae*

*T. durum* and *T. turgidum*, within the tetraploid wheats, had the lowest content in  $\alpha$ -gliadins. *T. aestivum* is the specie with an  $\alpha$ -gliadin content significantly lower than the rest of the hexaploids species. For barley and rye, the cultivated species had significantly lower content of  $\alpha$ -gliadins than the wild relatives. Regarding the content of  $\gamma$ -gliadins, the tetraploid and hexaploid wheats had a similar trend than the  $\alpha$ -gliadins. For the  $\omega$ -gliadins, *T. durum* and *T. aestivum* showed the lowest content for tetraploids and hexaploids, respectively. Concerning the HMW and LMW glutenin subunits, among tetraploids *T. dicoccoides* is the specie with the highest content of HMW. This specie, and *T. durum* showed the highest content in LMW. *T. aestivum* and *T. spelta* are the hexaploid species with the major content in HMW and LMW. Between the *Secale* species there are not significant differences in relation to the glutenin content.

When we made a clusterization, including all protein fractions and total gluten, three clear groups were observed; the third group is formed mainly by domesticated species and stays together the cultivated species *T. aestivum*, *T. durum*, *H. vulgare* and *S. cereale*. The proteins distributions of these species were very similar. Comparison of thousand kernel weight by genome and between the domesticated and non-domesticated species shows higher value for domesticated species.

#### *Distribution and abundance of celiac disease epitopes in the Triticeae*

The species with a high number of epitopes in their protein sequences were *S. cereale*, *A. tauschii*, and *T. aestivum*, between these species there are not significant differences in the number of epitopes. When comparing the number of epitopes by genome, those species containing the DD genome had the highest number of epitopes. The genomes with lowest number of epitopes were the BB, HH and AA. Comparison of the BBAA and BBAADD genomes showed significant differences, with BBAADD

containing more epitopes per sequences. On the other hand, the hordeins and secalins sequences were searched for the presence and abundance of CD epitopes. As a result, it is clear that hordeins and secalins had a different CD epitope profile. It is outstanding that *H. vulgare* had not epitopes described in  $\alpha$ -gliadins, while *S. cereale* had all of them.

In conclusion with the domestication do not increase the gluten content in *Triticeae* species studied here, and with the breeding the content was decreased. Cultivate barley could be an alternative cereal with low immunogenic epitopes and low content of gluten, but not safe for celiacs. Among the cultivated species durum wheats are the ones that have the lower content of gluten and immunogenic epitopes for celiac. It is also worth noting that among the hexaploids wheats, bread wheat is the one with the lowest gluten content, and although it has the 33-mer epitopes, when comparing modern bread wheat varieties with landraces and *T. spelta*, bread wheat is the least immunoreactive. With the use of lines with lower gluten content and immunogenic epitopes, we will have less exposure to these epitopes, therefore it may reduce the incidence of the CD.

**Acknowledgments** The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Projects AGL2013-48946-C3-1-R and AGL2016-80566-P), and the European Regional Development Fund (FEDER). The technical assistance of Ana García and Tadeo Bellot are acknowledged. Carmen V. Ozuna also acknowledges financial support from Fundación Carolina.

## References

- Arentz–Hansen, H., McAdam, S.N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B., Lundin, K.E.A., Jørgensen, T.J.D., Jung, G., Roepstorff, P. and Sollid, L.M.** (2002) Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology*, **123**, 803-809.
- Belderok, B.** (2000) Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr*, **55**, 1-14.
- Gobbetti, M., Giuseppe Rizzello, C., Di Cagno, R. and De Angelis, M.** (2007) Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food microbiology*, **24**, 187-196.
- Lohi, S., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Laurila, K., Collin, P., Rissanen, H., Lohi, O., Bravi, E., Gasparin, M., Reunanen, A. and Maki, M.** (2007) Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **26**, 1217-1225.
- Rewers, M.** (2005) Epidemiology of celiac disease: What are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterology*, **128**, S47-S51.
- Rubio-Tapia, A., Kyle, R.A., Kaplan, E.L., Johnson, D.R., Page, W., Erdtmann, F., Brantner, T.L., Kim, W.R., Phelps, T.K., Lahr, B.D., Zinsmeister, A.R., Melton, L.J., 3rd and Murray, J.A.** (2009) Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*, **137**, 88-93.
- Rubio-Tapia, A. and Murray, J.A.** (2010) Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol.* **26**, 116-122.
- Sapone, A., Lammers, K.M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M.T., De Rosa, M., Stefanile, R., Mazzarella, G., Tolone, C., Russo, M.I., Esposito, P., Ferraraccio, F., Carteni, M., Riegler, G., de Magistris, L. and Fasano, A.** (2011) Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med*, **9**, 23.
- Shewry, P.R.** (2009) Wheat. *Journal of experimental botany*, **60**, 1537-1553.
- Shewry, P.R. and Halford, N.G.** (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization.
- Shewry, P.R., Hawkesford, M.J., Piironen, V., Lampi, A.M., Gebruers, K., Boros, D., Andersson, A.A., Aman, P., Rakszegi, M., Bedo, Z. and Ward, J.L.** (2013) Natural variation in grain composition of wheat and related cereals. *Journal of agricultural and food chemistry*, **61**, 8295-8303.
- Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C. and Koning, F.** (2012) Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*, **64**, 455-460.

**Tatham, A.S. and Shewry, P.R.** (2012) The S-poor prolamins of wheat, barley and rye: Revisited. *Journal of Cereal Science*, **55**, 79-99.

**Wieser, H.** (2000) Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. *Eur Food Res Technol*, **211**, 262-268.



## Capítulo 4

Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: an alternative to the gluten free diet with no long-term adverse effects

Enviado a:/ Submitted to:

---

**Ozuna, C.V., Barro, F.** (2017) Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: an alternative to the gluten free diet with no long-term adverse effects. *Plos One* (Submitted)





## Resumen

Las patologías asociadas al gluten han aumentado en los últimos años con lo cual hay una gran demanda de productos sin gluten. Las líneas transgénicas de trigo con bajo contenido en gliadinas han mostrado una baja reactividad frente a las células T, buenas propiedades para la panificación, y excelentes características sensoriales. Estas líneas con un bajo contenido en gliadinas podrían ser importantes para reducir el contenido de gluten y/o para elaborar productos sin gluten. El objetivo de este trabajo fue evaluar el posible efecto tóxico de la harina integral de trigo de una de las líneas transgénicas con bajo contenido en gliadinas, en un ensayo de administración a ratas por 90 días, como paso previo al estudio clínico con pacientes celíacos. En este ensayo se usaron ratas Sprage Dawley (SD) machos (n=50) y hembras (n=50). Estas fueron alimentadas con dosis de 1.42, hasta 5.67 g/kg/día de la línea transgénica E82, 5.67 g/kg/día de la línea no-transgénica (WT) y un grupo blanco que solo se alimentó con dieta para roedores. Encontramos que no hubo diferencias significativas en cuanto al desarrollo de los animales. Las pruebas de función hepática y las pruebas bioquímicas para la función renal fueron similares para hembras y machos de todos los grupos. Otros parámetros hematológicos y metabólicos medidos en sangre, así como el peso de órganos no han mostrado diferencias significativas en los cinco grupos de animales. En el estudio histopatológico realizado para la dosis más alta de la línea transgénica E82, WT y el grupo blanco, no se han observado anormalidades para estos grupos. La harina integral de la línea transgénica de trigo con bajo contenido en gliadinas administrada a ratas en diferentes dosis no ha tenido efectos adversos y no hubo diferencias con el grupo de ratas que se alimentó con el trigo WT.

**Palabras clave:** Dieta libre de gluten; intolerancia al gluten; fragmentos ARNi; trigo harinero; ratas Sprague Dawley

**Enviado a:** Revista *PlosOne*. Este artículo está bajo revisión en PlosOne. Debido a problemas de derecho de autor, los resultados de este artículo no pueden incluirse en esta versión online. Está incluido el resumen.

**Abstract**

Gluten-associated pathologies have increased in recent years and there is a greater demand for gluten-free products. Transgenic low-gliadin wheat lines showed low T-cell response, good bread making properties, and excellent sensory assets. These low-gliadin lines could be important for reducing gluten content and/or for producing gluten-free products. The aim of this study was to evaluate the safety of the whole-wheat flour from one transgenic low-gliadin line in a 90-day feeding study, prior to a clinical trial with coeliac patients. In this study male (n=50) and females (n=50) SD rats were used. They were fed with doses of 1.42, to 5.67 g/kg/day of the transgenic E82 line, 5.67 g/kg/day of the WT flour and a blank group that only ate rodent diet. We found that there were no significant differences in the development of animals. Liver function tests and blood biochemistry for kidney function were similar for males and females of all groups. Other haematological and metabolic blood parameters measured, as well as organ weight did not show significant differences in the five groups of animals. In the histopathological study performed for the higher dose of transgenic E82 line, WT and blank group no abnormalities were observed for the groups. The whole-wheat flour of the transgenic low-gliadin line administered to rats at different doses did not have any adverse effects and there was no difference with the group of rats which were fed with the WT wheat.

**Key words:** Gluten free diet; gluten intolerance; RNAi fragments; bread wheat; Sprague Dawley rats

**Submitted to:** Journal *PlosOne*. This article is under review in PlosOne. Due to Copyright problems, the results of this article cannot be included in this online version. It includes the abstract.

Wheat is the main source of protein in the human diet. These proteins provide unique viscoelastic properties to dough (Shewry 2009, Wieser and Koehler 2009) that makes it suitable for a range of uses in the food industry. However, gluten proteins are responsible for triggering certain pathologies in susceptible individuals. The solution is a gluten-free diet (GFD) for life (Silvester and Rashid 2007). Although there are gluten-free grains such as rice, corn, sorghum, quinoa and others, they do not have good bread making properties (Rosell *et al.* 2014). Gluten-free diets are characterised by an unbalanced intake of different nutrients, with an excess of saturated and hydrogenated fatty acids, poor in alimentary fibre, low contribution to the recommended daily protein intake, and high carbohydrate, providing an increase in the glycaemic index (Vici *et al.* 2016). Therefore, the development of new varieties of gluten free cereals with good quality and good organoleptic properties is of high interest.

Using RNA technology has been generated low-gliadin lines (Gil-Humanes *et al.* 2010). Among all low-gliadin lines, one line (named E82) was very promising as it contained very few CD immunogenic epitopes (Barro *et al.* 2015). The aim of the present study was to evaluate the potential toxic effects of whole wheat flour of the transgenic low-gliadin line E82, in comparison with the corresponding non-transgenic bread wheat line BW208, previous step to clinical assay with celiac patients. Whole flour was tested at three different doses, administrated daily to Sprague Dawley rats, for 90 days. To assess potential toxic effects a haematology assay was made, measuring blood biochemistry parameters specific for the proper functioning of the liver and kidney, as well as other metabolic parameters, and a detailed histological analysis.

In total 100 animals were used, of which 50 were males and 50 females. The maximum dose to be administered was calculated based on cereal consumption in OECD countries, according to the National Survey of Dietary Intake Spanish (ENIDE), Dutch National Food Consumption Survey, and the Summary of the Individual and National Study on Food Consumption (INCA 2) in France (AFSSA 2007, van Rossum *et al.* 2011). The E82 line only has about 2.8% of gluten in relation to the wild type. Total gluten determinations (ppm) were carried out by ELISA using the monoclonal antibody R5 as described (Ferre *et al.* 2004). At the end of the

treatments, all animals were deprived of food for approximately 18 hours before sacrifice and deeply anaesthetized with isoflurane. Blood samples were extracted from the heart by intracardiac injection.

The weight of animals was measured every week during the 90 days of study. Weight gain of males and females during the study was similar in all groups. Regarding food intake, it was also measured every week, the male groups have higher intake than the female, and this was expected because males have higher body weight. Within the males group intake was very similar between the different treatments, the same occurs within the females group. In terms of water consumption, both groups had similar consumption, although males consume more water than females, which is also explained by the greater body weight.

In total 14 haematological indicators were determined, in which no significant differences between different treatments groups, for both females and males were found. Sixteen biochemical indicators were determined, in which no significant differences between the five treatment groups, for both, males and females were found. The values are means of each biochemical indicator measured in 10 animals of each treatment group.

Indicators of liver function did not show significant differences of these markers for both, males and females. The kidney is responsible of removing waste elements from blood. Therefore, any damage to the kidney has been registered. Histological examinations performed on a wide set of organs and tissues from all animals from groups: blank, 5.67 E82 and 5.67 WT, have not shown irregularities in the tissues.

In conclusion, based on the results reported in this 90-day feeding study, the whole-wheat flour of the low-gliadin wheat line E82 administered to male and female rats at different doses did not have any adverse effects on health status in rats, and therefore it can be used for human trials. The low-gliadin wheat line reported in this study could be an excellent alternative for celiac patients, not only to improve palatability and nutritional quality (Gil-Humanes *et al.* 2014), but also to reduce the cost of gluten-free products (Escudero-Hernandez *et al.* 2016).

**Acknowledgments:** The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Projects AGL2013-48946-C3-1-R and AGL2016-80566-P), the European Regional Development Fund (FEDER) and Junta de Andalucía (Project P11-AGR-7920) supported this work. We thank Dr. Paul Lazzeri (Agrasys, SL, c/ Torrent de l'Olla, 216, 0812 Barcelona, Spain) for his critical review of the manuscript.

## References

- AFSSA** (2007) Summary of the Individual and National Study on Food Consumption 2 (INCA 2) 2006-2007.
- Barro, F., Iehisa, J.C.M., Gimenez, M.J., Garcia-Molina, M.D., Ozuna, C.V., Comino, I., Sousa, C. and Gil-Humanes, J.** (2015) Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing-fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnol J.* 1-11.
- Escudero-Hernandez, C., Pena, A.S. and Bernardo, D.** (2016) Immunogenetic Pathogenesis of Celiac Disease and Non-celiac Gluten Sensitivity. *Curr Gastroenterol Rep*, **18**, 36.
- Ferre, S., Garcia, E. and Mendez, E.** (2004) Measurement of hydrolyzed gliadins by a competitive ELISA based on monoclonal antibody R5: Analysis of syrups and beers. In *Proceedings of the 18th Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity* (Stern, M. ed. Zwickau, Sweden: Verlag Wissenschaftliche Scripten, pp. 65-69.
- Gil-Humanes, J., Piston, F., Altamirano-Fortoul, R., Real, A., Comino, I., Sousa, C., Rosell, C.M. and Barro, F.** (2014) Reduced-gliadin wheat bread: an alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. *PLoS One*, **9**, e90898.
- Gil-Humanes, J., Piston, F., Tollefsen, S., Sollid, L.M. and Barro, F.** (2010) Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 17023-17028.
- Rosell, C.M., Barro, F., Sousa, C. and Mena, M.C.** (2014) Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. *J Cereal Sci.*, **59**, 354-364.
- Shewry, P.R.** (2009) Wheat. *J Exp Bot*, **60**, 1537-1553.
- Silvester, J.A. and Rashid, M.** (2007) Long-term follow-up of individuals with celiac disease: An evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol*, **21**, 557-564.
- van Rossum, C.T.M., Fransen, H.P., Verkaik-Kloosterman, J., Buurma-Rethans, E.J.M. and Ocké, M.C.** (2011) *Dutch National Food Consumption Survey 2007-2010*.
- Vici, G., Belli, L., Biondi, M. and Polzonetti, V.** (2016) Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clin Nutr*, **35**, 1236-1241.
- Wieser, H. and Koehler, P.** (2009) Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? *Eur Food Res Technol*, **229**, 9-13.



## **Capítulo 5**

Conclusiones





## Conclusiones

1. El análisis de las  $\alpha$ -gliadinas de trigo a partir de un conjunto de genotipos diploides y poliploides ha permitido la identificación de seis tipos de  $\alpha$ -gliadinas, de los cuales solo el tipo 1 contiene todos los péptidos y epítomos inmunogénicos, y los otros cinco tipos restantes no contienen epítomos del 33-mer, el péptido más inmunogénico descrito hasta ahora.
2. Las técnicas de secuenciación masiva de amplicones son muy útiles para la caracterización de regiones génicas complejas, como el complejo inmunogénico 33-mer, lo que permite la selección de variedades que contienen menor abundancia de epítomos tóxicos.
3. El complejo inmunogénico 33-mer con seis epítomos solapantes evolucionó en trigo harinero después del proceso de poliploidización.
4. La identificación y clasificación de los seis tipos de gliadinas permitirá la aplicación de técnicas avanzadas de edición del genoma (como TALENs y CRISPR/Cas9) de forma muy precisa sobre pequeños grupos de  $\alpha$ -gliadinas que contienen los péptidos más inmunogénicos, preservando aquellas otras que no contienen dichos péptidos y que contribuyen a la calidad harino panadera de trigo.
5. La caracterización de las proteínas de reserva en las *Triticeae* indica que el proceso de domesticación y mejora ha contribuido a disminuir el contenido en gluten en general, y en particular el contenido en gliadinas, las proteínas mayoritariamente inmunogénicas en las *Triticeae*.
6. La cebada, podría ser un cereal alternativo de gran valor añadido para disminuir la exposición a epítomos inmunoreactivos en relación a la EC, ya que tiene un bajo contenido en gluten y epítomos inmunogénicos.

7. Las variedades modernas y cultivadas de trigo duro y harinero contienen menor contenido en gluten y epítomos inmunogénicos en relación a la EC que sus ancestros o variedades antiguas como el trigo espelta.
8. La harina integral procedente de la línea transgénica E82, con muy bajo contenido en gluten, administrada a ratas durante 90 días a dosis de 1.42, 2.83 y 5.67 g/kg/día no tuvo efectos adversos a largo plazo sobre el crecimiento y desarrollo de los animales, y por lo tanto se considera segura para su administración en ensayos clínicos con humanos.
9. El nivel sin efecto adverso observable (NOAEL por sus siglas en inglés) del ensayo de seguridad alimentaria de trigos transgénicos con muy bajo contenido en gliadinas es de 5.67 g/kg/día. La línea de trigo baja en gliadina evaluada en este estudio podría ser una excelente alternativa para los pacientes celíacos, no solamente para aumentar la palatabilidad y el valor nutricional, sino también para reducir el costo de los productos sin gluten.