

Progetto di ricerca e piano delle attività

Digeribilità ed effetti intestinali della pasta di grano duro ottenuta con diversi diagrammi di essiccazione

Lo **scopo dello studio** è valutare: (i) la bioaccessibilità e la biodisponibilità delle proteine contenute nella pasta; (ii) l'effetto della pasta digerita sull'infiammazione delle cellule intestinali e sul microbiota intestinale.

Risultati attesi: Valutazione dell'impatto della materia prima e del ciclo di essiccazione sulla digeribilità della pasta; studio della digeribilità delle proteine in presenza di polifenoli e fibre; informazioni sull'impatto delle diverse materie prime e condizioni di lavorazione sulle caratteristiche nutrizionali della pasta, sull'infiammazione intestinale e sulla composizione del microbiota

Piano delle attività

Verrà applicato il metodo statico standardizzato INFOGEST per simulare la digestione gastrointestinale della pasta cotta. Aliquote di campioni di pasta digerita saranno ultrafiltrate per separare molecole con una dimensione compatibile con l'assorbimento ($<3\text{kDa}$), e la frazione $<3\text{kDa}$ di pasta sarà supplementata a cellule Caco-2. La linea cellulare intestinale umana Caco-2, originariamente derivata da un carcinoma del colon, è un modello in vitro spesso utilizzato per valutare l'assorbimento dei nutrienti, poiché queste cellule esprimono varie proprietà biologiche (es.: presenza di giunzioni serrate, secrezione di enzimi digestivi, sistemi di trasporto attivi, recettori, produzione di citochine) tipiche degli enterociti assorbenti con orletto a spazzola che sono presenti nell'intestino tenue. Per simulare più da vicino le condizioni steriche dell'intestino in vivo, le cellule Caco-2 saranno coltivate su inserti filtranti permeabili (Transwell™), che possono migliorare la loro differenziazione morfologica e funzionale e imitare il trasporto transepiteliale dei nutrienti dalla camera apicale a quella basolaterale.

Negli esperimenti preliminari, le cellule Caco-2 verranno supplementate per 4 ore con una concentrazione scalare della frazione $<3\text{kDa}$ della pasta digerita e la citotossicità sarà valutata mediante il dosaggio del metiltiazolidifenil-tetrazolio bromuro (MTT), il test di esclusione del trypan blue e l'esame microscopico. La più alta concentrazione non tossica di pasta digerita verrà utilizzata per supplementare le cellule Caco-2 coltivate nel sistema di celle a diffusione Transwell™. Dopo 4 ore di supplementazione, verranno raccolti i terreni nelle camere apicale e basolaterale.

I terreni raccolti dalla camera basolaterale verranno analizzati utilizzando la ^1H NMR metabolomica per valutare lo spettro completo delle molecole assorbite dalle cellule intestinali. Gli spettri del medium prelevato dalla camera basolaterale saranno confrontati con gli spettri della frazione $<3\text{kDa}$ della pasta digerita per calcolare la biodisponibilità delle proteine e dei metaboliti derivati dall'amido. Inoltre, la pasta digerita verrà supplementata alle cellule confluenti Caco-2 per verificarne il potenziale effetto antinfiammatorio a livello intestinale. I mediatori infiammatori, principalmente citochine e chemochine, rilasciati nel mezzo saranno quantificati con test immunologici AlphaLISA® validati (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA). I risultati verranno confrontati con i valori ottenuti in cellule supplementate con bianco della digestione (digestione in vitro effettuata senza alimento). Infine, verrà utilizzato un modello in vitro di fermentazione intestinale per valutare l'impatto della pasta digerita sul microbiota intestinale. Le fermentazioni coloniche in vitro verranno eseguite utilizzando un sistema modello intestinale basato su bioreattori anaerobici MiniBio indipendenti (Applikon Biotechnology, NL). Il microbiota fecale (da 3 donatori sani) sarà inoculato in terreno basale con e senza il digerito di pasta e fermentato in ambiente standardizzato che simula l'ambiente delle tre sezioni del colon.

I principali cambiamenti del microbiota saranno valutati mediante Real-Time qPCR quantificando diversi taxa di Eubatteri (ad esempio Bacteroidetes, Firmicutes, Lactobacillales, Bifidobacteriaceae, Enterobacteriaceae, Ruminococcaceae, Clostridiaceae, Prevotella, Bacteroides, Faecalibacterium prausnitzii, Akkermansia muciniphila, Desulfovibrio spp., Ruminococcus albus, Bifidobacterium longum ed Escherichia coli). Dopo l'estrazione del DNA, l'amplificazione mediante PCR e l'isolamento dei geni target, le reazioni qPCR verranno condotte con QuantStudio 5 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). I metaboliti batterici e il volatiloma della fermentazione saranno rilevati anche mediante SPME GC-MS.

I risultati saranno elaborati mediante analisi multivariate per descrivere e correlare la genomica e la metabolomica batterica e valutare il potenziale effetto eubiotico della pasta sul microbiota intestinale.