2.6 ALTRI ALIMENTI

2.6.1 Valutazione nutrizionale di funghi eduli presenti in commercio: effetti delle tecnologie di produzione e della cottura casalinga
P. Manzi

2.6.2 Individuazione dei caratteri di tipicità delle produzioni olivicole a D.O.P. laziali attraverso la rilevazione dei fattori caratterizzanti la qualità degli oli.
G. Quaglia

2.7 BANCA DATI DI COMPOSIZIONE DEGLI ALIMENTI

2.7.1 Banca dati di composizione degli alimenti dell' INRAN: aggiornamento per gli alimenti più significativi dell'alimentazione italiana
E. Carnovale, L. Marletta

2.7.2 Sistema di informazione di composizione degli alimenti a livello europeo unificato ed accessibile in rete– (European food information resource.- EuroFir)
E. Carnovale, L. Marletta

2.7.3 BANCA DATI INTERATTIVA - Composizione degli alimenti e porzioni standard per conoscere meglio gli alimenti e costruire e valutare ricette e diete.
L. Marletta

2.7.4 Valutazione nutrizionale di alcuni piatti base della cucina italiana e messa a punto di un metodo per calcolare i nutrienti in alimenti composti e cucinati.
L. Marletta

2.7.5 Valutazione della qualità nutrizionale della dieta totale italiana apporto in nutrienti, composizione e stabilità della frazion lipidica, rischio di patologie cardiovascolari
G. Lombardi-Boccia

2.8 SVILUPPO DI METODOLOGIE

2.8.1 Metodologie chimico-analitiche per la valutazione della qualità dei prodotti alimentari.
R. Acquistucci, L. Pizzoferrato

2.8.2 Sviluppo di metodi rapidi per la valutazione della qualità tecnologica dei cereali mediante spettroscopia a riflettanza nel vicino infrarosso (NIRS)
R. Acquistucci

2.8.3 Nuovi parametri per la valutazione del potenziale nutrizionale delle leguminose
M. Carbonaro

2.8.4 Sistemi modello in vivo e in vitro per lo studio della biodisponibilità di proteine, minerali ed elementi in traccia dagli alimenti
M. Carbonaro

AREA 3.STUDI DI CONSUMI ALIMENTARI ED EDUCAZIONE ALIMENTARE

3.1 CONSUMI ALIMENTARI

3.1.1 Banche dati per studi a carattere nutrizionale
A. Turrini

3.1.2 I rifiuti derivanti da attività relative all'alimentazione
A. Turrini

3.2 MOTIVAZIONI DELLE SCELTE ALIMENTARI

3.2.1 La scelta degli alimenti, la tipologia dei pasti: promuovere l'indipendenza e la qualità di vita negli anziani
A. Saba

3.2.2 Il processo decisionale del consumatore nella scelta dei prodotti biologici.
A. Saba

3.2.3 La comunicazione nel campo delle allergie alimentari: informazione per i consumatori, i regolatori e l'industria.
A.Saba

3.2.4 Definizione di protocolli di educazione alimentare e nutrizionale per rendere il consumatore consapevole nella scelta dei prodotti biologici.
G. Pastore

3.3 EDUCAZIONE ED INFORMAZIONE ALIMENTARE

3.3.1 L'Educazione Alimentare veicolata attraverso il canale privilegiato della Ristorazione Scolastica
D. D'Addesa, S. Sette

3.3.2 Banca dati per la ristorazione
D. D'Addesa

3.3.3 Studio di protocolli di intervento di educazione alimentare e nutrizionale per la popolazione anziana
G. Pastore

AREA 4 SOSTENIBILITÀ E SVILUPPO DEI SISTEMI AGROALIMENTARI

4.1 ANALISI MULTIDIMENSIONALE DELLA SOSTENIBILITÀ DEI SISTEMI

4.1.1 Analisi multicriteriali e partecipative di qualità all'interno del sistema agro-alimentare basate sulla applicazione di principi di teoria dei sistemi complessi: valutazione integrata relativa all'uso su larga scala di organismi geneticamente modificati (OGM) nel sistema agro-alimentare (SAA) Italiano.
M. Giampietro

4.1.2 Preparazione di libri che presentino i risultati raggiunti negli anni precedenti
M. Giampietro

4.1.3 Progetto Europeo (ICA4-CT-2000-30031) South-East Asia in Transition
M. Giampietro

4.2 BIOTECNOLOGIE VEGETALI

4.2.1 Analisi funzionale dei fattori di trascrizione vegetali della classe HD-Zip. Studi su gerarchie, ridondanze, interdipendenze, evoluzione e utilizzazione del potenziale biotecnologico.
S. Baima, G. Morelli

4.2.2 Tecniche innovative per l'identificazione di marcatori molecolari associati alla tipicità del pomodoro campano Identificazione di determinanti genetici che regolano lo sviluppo di meristemi laterali e analisi sensoriale del pomodoro.
G. Morelli, F. Sinesio

PROGETTI STRATEGICI

1. EDUCAZIONE ALIMENTARE

2. PIANO DI COMUNICAZIONE

3. PROGETTO OGM IN AGRICOLTURA

PUBBLICAZIONI, COMUNICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONGRESSI, CONVEGNI E SEMINARI, RELAZIONI TECNICO-SCIENTIFICHE

AREA 1. STUDI NUTRIZIONALI PER LA TUTELA E LA SALUTE DELL'UOMO

AREA 2. QUALITÀ NUTRIZIONALE E TECNOLOGICA DEGLI ALIMENTI

AREA 3. STUDI DI CONSUMI ALIMENTARI ED EDUCAZIONE ALIMENTARE

AREA 4. SOSTENIBILITÀ E SVILUPPO DEI SISTEMI AGRO-ALIMENTARI E QUALITÀ TOTALE DEI PRODOTTI

ATTIVITÀ DIDATTICA, GRUPPI DI LAVORO NAZIONALI ED INTERNAZIONALI, ALTRE ATTIVITÀ

Attività didattica

Gruppi di lavoro nazionali ed internazionali

Attività istituzionale, Organizzazione di convegni, Altre attività

PAGINA BIANCA

AREA 1.

STUDI NUTRIZIONALI PER LA TUTELA DELLA SALUTE DELL'UOMO

PAGINA BIANCA

1.1 ASSORBIMENTO, TRASPORTO E METABOLISMO DI MICRONUTRIENTI A LIVELLO INTESTINALE E EPATICO

PAGINA BIANCA

1.1.1 - Trasporto dei retinoidi: 1-studio dei meccanismi dell'accumulo e della degradazione della retinol-binding protein (RBP) nei mammiferi.

S. Gaetani

Obiettivi
Identificare il meccanismo molecolare e le proteine coinvolte nella formazione del complesso e nella degradazione di RBP e TTR (transtiretina) quando in assenza di retinolo si accumulano nel Reticolo Endoplasmico.

Descrizione dell'attività
E' proseguito il progetto di ricerca che studia la secrezione della vitamina A dal fegato dove viene depositata proveniente dalla dieta come tale o come precursore ed in attesa di essere trasportata alle cellule. E' infatti indispensabile capire nei dettagli la regolazione di questa importante tappa della distribuzione della vitamina A e i meccanismi che la sottendono, per poter arrivare a stabilirne il fabbisogno considerando che sia dosi troppo alte che troppo basse sono dannose all'embrione e all'adulto. Per questi studi utilizziamo una linea di cellule epatiche di topo (MMH), immortalizzata ma non trasformata in cui abbiamo dimostrato (Bellovino et al. J. Cell. Physiol. 181, 24-32, 1999) che la secrezione di RBP è regolata dal retinolo come nell'animale *in vivo*. Queste cellule cresciute su collagene, non esprimevano la TTR che è stata da noi indotta sostituendo gelatina al collagene. L'espressione di TTR è stata dimostrata mediante ibridazione "Northern" dopo 5 giorni di crescita su gelatina. Non possedendo anticorpi anti TTR di topo, ancora non sappiamo se l'RNA messaggero viene tradotto. Infatti da prove fatte sul siero, gli anticorpi da noi preparati contro la TTR di ratto, riconoscono molto male la TTR di topo e non sappiamo quindi se viene tradotta dall'mRNA ed è troppo poca per essere vista dal nostro anticorpo, o se non viene affatto sintetizzata. Stiamo ora preparando un cDNA di topo per esprimerlo in E. coli, isolare la proteina, iniettarla in coniglio e produrre anticorpi specifici. Abbiamo ora chiarito con quale meccanismo viene regolata la quantità di RBP che si accumula nel Reticolo Endoplasmico (RE) in carenza di vitamina A e perché questa quantità non supera mai le 4-5 volte anche aumentando di molto la gravità della carenza. L'eccesso infatti della proteina viene degradato nella via a ritroso proteasomica; bloccando questa via degradativa, si accumula la proteina nella cellula, indicando che la via proteasomica è almeno uno dei meccanismi messi in atto dalla cellula. E' stata indagata anche la via degradativa lisosomiale che non si è dimostrata attiva nella regolazione della degradazione della RBP in assenza di retinolo. Mediante l'uso di "cross linkers" e di esperimenti di marcatura metabolica con amino acidi marcati, stiamo ora studiando i "chaperoni" coinvolti nella formazione del complesso retinolo-RBP-TTR.

Parole chiave
Retinolo, RBP, TTR,

Partecipanti alla ricerca	**mesi/persona**	**Qualifica**
S. Gaetani	3	D.RIC
D. Bellovino	4	RIC-C
M. Apreda	6	DOTT
I. Garaguso	2	CTER
M. Mercuri	6	SPE
S. Gragnoli	9	TES

Collaborazioni esterne
Rodolfo Berni, Istituto di Biochimica, Facoltà di Scienze, Università di Parma

1.1.2 - Valutazione di nuovi marcatori dello Stato di Nutrizione in un campione di popolazione sana e di soggetto a rischio (anziani, lungodegenti, anoressici, vegetariani, obesi, cardiopatici, epatoepatici)

S. Gaetani

Obiettivi
L'obiettivo principale di questo progetto è la ricerca e validazione di nuovi marcatori per lo stato di nutrizione su popolazione sana e a rischio, che mettano in evidenza carenze marginali di micronutrienti. L'obiettivo specifico dell'Unità Operativa dell'INRAN è quello di validare in soggetti normali e a rischio di malnutrizione proteica e per la vitamina A, il rapporto RBP/TTR come indice di valutazione dello stato di nutrizione per la vitamina A.

Descrizione dell'attività
Questo progetto, finanziato dal Ministero della Salute, si compone di 10 Unità Operative, quasi tutte cliniche che operano nelle Facoltà di Medicina e che reperiranno i gruppi di soggetti da studiare. Molta enfasi sarà data ai vegetariani che sono in grande aumento nel paese e a cui quindi è giusto cominciare a dare un po' di attenzione dal punto di vista di possibili stati di malnutrizione. La nostra Unità Operativa si propone di misurare nel plasma di soggetti normali presi come controllo e in gruppi di soggetti a rischio di malnutrizione proteica e di vitamina A, la proteina che lega il retinolo (RBP) e la transtiretina (TTR) per saggiare se è vero quanto sostenuto da alcuni gruppi di ricerca che il rapporto RBP/TTR è un buon indice di stato di nutrizione per la vitamina A che non viene influenzato da stati di altre carenze e soprattutto da stati infiammatori che molto spesso si accompagnano a stati carenziali nutrizionali. Infatti, in carenza di vitamina A il rapporto RBP/TTR si riduce di molto e la interazione strutturale e funzionale fra le due proteine persiste anche durante le infezioni o in caso di malnutrizione. Secondo alcuni autori la valutazione della mutua dipendenza-correlazione fra le due proteine ha mostrato che la TTR spiega il 70%-80% della varianza della RBP e viceversa in pazienti con malattie del fegato, operazioni chirurgiche, traumi, malaria, morbillo o malnutrizione. Questi dati sono stati recentemente confermati da alcuni autori ma non da altri. Data la sensibilità, specificità, semplicità e riproducibilità della determinazione di queste proteine che rendono questo saggio molto più vantaggioso della determinazione della vitamina A, ci è sembrato che valesse la pena validarlo in Italia in un grosso progetto di valutazione dello stato di nutrizione. Tenteremo anche di validarlo in cellule epatiche in coltura in diverse condizioni sperimentali.
Per il momento abbiamo analizzato un gruppo soggetti di controllo (30 individui) adulti e sanied abbiamo constatato che la variabilità per quanto riguarda albumina ed RBP è molto bassa, mentre un po' più elevata è la variabilità della TTR serica. Abbiamo quindi deciso di aumentare il numero dei soggetti di controllo per la determinazione della TTR. Siamo ora in attesa dei sieri di un gruppo di vegetariani che vengono raccolti un'altra unità operativa, e che ci sembra possano essere molto utili per validare la TTR come indice di stato di nutrizione.

Parole chiave
Vitamina A, stato di nutrizione, RBP, TTR

Partecipanti alla ricerca	**mesi/uomo**	**Qualifica**
S. Gaetani	3	D.RIC
D. Bellovino	3	RIC-C
I. Garaguso	3	CTER
M. Apreda	2	DOT
M. Mercuri	4	SPE
V. Gentili	2	CTER

Collaborazioni esterne

Claudio Macchi, Fondazione Don Carlo Gnocchi-IRCCS, Pozzolatico (FI), coordinatore
Alessandro Casini, U.O. Gastroenterologia, Università di Firenze
R. Abbate, Fisiopatologia e Clinica dell'Arteriosclerosi, Università di Firenze
Mugelli, Dipartimento di Farmacologia, Università di Firenze
M. L. Brandi, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze
A. De Lorenzo, Dipartimento di Neuroscienze, Università di Roma, "Tor Vergata"
G. Testolin, DISTAM, sezione Nutrizione, Università di Milano
E. V. Cosmi, II Clinica Ostetrica, Università di Roma, "La Sapienza"
L. Ferrucci, Dipartimento di Geriatria, INRCA, Firenze

1.1.3 - Trasporto dei retinoidi: Proteine che trasportano i retinoidi in pesci teleostei

D. Bellovino

Obiettivi

Obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di verificare se, e con quali meccanismi, la concentrazione di retinolo nella dieta gioca un ruolo nell'alta percentuale di malformazioni che si riscontra nello sviluppo embrionale dei pesci allevati in acquacoltura.

Descrizione dell'attività

Dopo l'isolamento e la caratterizzazione della RBP di carpa effettuata negli scorsi anni, questa ricerca è proseguita con lo studio della funzione dei due gruppi -N-glicosilici che caratterizzano questa proteina differenziandola da tutte le altre RBP studiate che ne sono prive. Ci siamo avvalsi degli anticorpi anti RBP di trota e di carpa, ambedue da noi preparati. Abbiamo esaminato per "Western blot" sul siero, molti pesci di acqua dolce e di acqua salata, dopo averli trattati e non con Endo-F che rompe il legame fra la proteina e lo zucchero, per capire la funzione della glicosilazione in questa proteina attraverso le caratteristiche del pesce. La RBP di carpa ha un'altra caratteristica unica che abbiamo messo in evidenza: la sequenza segnale non viene rimossa dal resto della proteina durante la traslocazione della catena peptidica nascente nel Reticolo Endoplasmico (RE) (Bellovino et al. J. Biol. Chem. 276, 13949-56, 2001), come invece avviene per tutte le proteine secretorie e per la quasi totalità delle proteine integrali di membrana. La RBP di pesce inoltre non circola nel plasma sotto forma di complesso con la TTR come in tutti gli altri animali e quindi, date le sue piccole dimensioni, è più soggetta ad essere persa per filtrazione attraverso il rene. E' stato quindi ipotizzato che la funzione dello zucchero possa essere quella di impedirne la perdita per filtrazione attraverso i glomeruli renali aumentandone le dimensioni e la carica negativa. E' stato anche ipotizzato che ci potesse essere una differenza fra pesci di acqua dolce e di acqua salata. In realtà di tutti i pesci analizzati è risultata glicosilata solo oltre alla RBP di carpa, la RBP di *Carassius auratus* (pesce rosso) che appartiene alla stessa famiglia della carpa. Il *Danio rerio* (pesce zebra), ha un solo sito putativo di N-glicosilazione nella sequenza nucleotidica, che è risultato glicosilato. Stiamo ora studiando la funzione della glicosilazione a livello della traslocazione nel RE e della secrezione dal RE. La maggior parte delle glicoproteine, se private della parte glucidica, non vengono secrete dalla cellula in quanto lo zucchero è indispensabile all'acquisizione della struttura della proteina matura che viene in caso di mancata glicosilazione degradata prima di uscire dal RE. Per studiare in maniera diretta e approfondita il significato della porzione glucidica dell'RBP di carpa, abbiamo costruito attraverso mutagenesi diretta tre cloni mutanti della proteina in cui mancano rispettivamente il primo, il secondo o entrambi i siti consenso per la glicosilazione. I mutanti sono stati utilizzati in esperimenti di traduzione *in vitro* della proteina in un lisato di reticulociti e con trasfezioni transienti in cellule Cos. Trasfettando questi costrutti in cellule Cos si è visto che a differenza del "wild type" che viene secreto con grande efficienza, il doppio mutante non viene secreto nel mezzo di coltura, mentre i due mutanti singoli vengono secreti ma con minore efficienza. I risultati di traduzione *in vitro* in un lisato di reticolociti in presenza di membrane microsomiche hanno dimostrato che mentre la RBP "wild type" è protetta dall'attacco delle proteasi all'interno delle vescicolo microsomiche, i due mutanti lo sono parzialmente e il doppio mutante non lo è affatto. Questi risultati insieme a esperimenti di immunolocalizzazione in cellule Cos trasfettate con i costrutti mutanti di RBP e semipermeabilizzate, insieme ai risultati *in vivo*, dimostrano una funzione degli zuccheri nel processo di traslocazione della proteina. Fino a pochi anni fa, la TTR non era mai stata identificata nel plasma dei pesci come complesso con la RBP, e si pensava quindi che non fosse espressa in questi animali. Recentemente invece è stata isolata da ricercatori portoghesi nell'orata. Utilizzando come sonda il cDNA di TTR di orata, nell'ambito di un progetto bilaterale con l'Università di Faro in Portogallo, abbiamo isolato il clone intero di TTR

di carpa da una "library" di fegato. Lo abbiamo sequenziato e abbiamo depositato la sequenza nella "Banca dati" dell'EMBL. Abbiamo poi studiato per ibridazione Northern l'espressione nei diversi tessuti (l'RNA messaggero viene espresso nel fegato e nel cervello) e lo abbiamo trascritto e tradotto in vitro in un lisato di germe di grano che si è dimostrato più adeguato del lisato di reticolociti per questa proteina. La proteina è stata anche espressa in E.coli e sono stati prodotti anticorpi in coniglio che ci permetteranno di seguirla e di studiare la sua interazione con l'RBP.

Parole chiave
Pesci, RBP, TTR, glicosilazione

Partecipanti alla ricerca	**mesi/persona**	**.....Qualifica**
D. Bellovino	6	RIC-C
S. Gaetani	4	D.RIC
M. Apreda	6	DOT
M. Mercuri	6	SPE

Collaborazioni esterne
Deborah Power, Universidad do Algarve, Centro Ciencia del Mar, Campos Gambelas, Faro, Portogallo.
Rodolfo Berni, Istituto di Biochimica, Facoltà di Scienze, Università di Parma.

1.1.4 Sviluppo e messa a punto del sistema cellulare Caco-2 come modello in vitro di barriera intestinale.

Y. Sambuy, M. L. Scarino

Obiettivi

Standardizzare il modello intestinale in vitro Caco-2 comparando 4 differenti linee e cloni in diverse condizioni di coltura utilizzando:

a) parametri comuni agli epiteli differenziati (misura della permeabilità del monostrato cellulare)

b) parametri specifici della cellula intestinale assorbente differenziata quali il trasporto di ferro (trasporto protone-dipendente) ed acido taurocolico (trasporto sodio-dipendente)

Descrizione dell'attività

Al completamento della fase I del progetto ECVAM (nel gennaio del 2003), che ha finanziato l'attività riportata nel presente consuntivo, sulla base dei risultati ottenuti nei saggi comuni e specifici eseguiti da ciascun partecipiante è stata presa la decisione collettiva di studiare nella fase II del progetto soltanto due dei quattro tra cloni e linea parentale delle cellule Caco-2 precedentemente utilizzati e cioè il clone TC7 ed il clone AQ e di usare per gli esperimenti cellule differenziate al giorno 15° dalla semina.

I compiti specifici affidati al gruppo dell'INRAN sono stati: misurare il passaggio paracellulare di mannitolo triziato e la resistenza elettrica transepiteliale (TEER) come marcatori della permeabilità paracellulare e l'attività dell'enzima fosfatasi alcalina come marcatore di differenziamento epiteliale. I due cloni sono stati coltivati in mezzo di controllo (CM) e cioè mezzo essenziale di Dulbecco con supplementi di aminoacidi non essenziali, glutamina e antibiotici (D-MEM) addizionato con 10% siero fetale bovino (FCS) oppure in mezzo definito (DM) e cioè D-MEM addizionato con una miscela di isulina,-transferrina-selenio e lipidi (ITS-L). I due cloni sono stati differenziati in condizioni asimmetriche e cioè solo D-MEM nel compartimento apicale e rispettivamente DMEM più 10%FCS per il CM e DMEM più ITS-L per il DM nel compartimento basolaterale. I risultati sono stati paragonati a cellule differenziate in CM in condizioni simmetriche (CM-S) e cioè D-MEM addizionato con 10% FCS in entrambi i compartimenti al 15° giorno dalla semina. I dati raccolti hanno portato alle seguenti conclusioni:

- Condizioni di coltura simmetriche verso asimmetriche

In entrambi i cloni TC7 ed AQ l'uso del CM asimmetrico modifica principalmente l'attività della fosfatasi alcalina (che risulta più bassa in condizioni asimmetriche).

- Effetto del mezzo di controllo rispetto al mezzo definito negli esperimenti di fase I e fase II

In entrambi i cloni il CM è in grado di produrre risultati migliori e maggiormente riproducibili rispetto al DM. La TEER e simile o più alta, la permeabilità al mannitolo sempre più bassa (indicando una migliore maturazione del complesso giunzionale) e la fosfatasi alcalina coerentemente più alta nelle cellule coltivate in CM rispetto al DM, indicando complessivamente il raggiungimento di un migliore differenziamento epiteliale.

- Prestazioni dei due cloni

Il clone TC7 mostra in generale risultati maggiormente riproducibili se paragonato al clone AQ per tutti i parametri e le condizioni di coltura analizzati. Inoltre l'attività della fosfatasi alcalina è più alta nel clone TC7 se paragonata aquella del clone AQ dopo differenziamento sia in mezzo di controllo che definito. La permeabilità al mannitolo risulta sempre più bassa nel clone TC7 rispetto al clone AQ, indicando una maggiore chiusura funzionale del complesso giunzionale. I bassi valori di TEER del clone TC7 (se comparato al clone AQ) derivano probabilmente da differenze intrinseche nell'architettura del complesso giunzionale e non riflettono accuratamente cambiamenti funzionali che si verificano durante il differenziamento, come dimostrato dai bassi valori della permeabilità paracellulare del mannitolo misurati corrispondentemente.

In conclusione, sulle basi dei nostri risultati, il modello cellulare che può attualmente meglio rappresentare l'intestino in vitro è il clone TC7 coltivato in mezzo di controllo

Parole chiave
Caco-2, TEER, trasporto intestinale, ferro, acido taurocolico, pre-validazione

Partecipanti alla ricerca	**Mesi /persona**	**Qualifica**
Y. Sambuy	1	P.RIC
M.L.Scarino	3	RIC
R. Consalvo	7	A.R.
G. Ranaldi	1	RIC.C

Collaborazioni esterne		
Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio TCE Roma, ITALIA	A.Stammati	D.RIC
INSERM U505 Paris, FRANCIA	M. Rousset	D.RIC
University of Vienna, Medical School, Departement of Pathophysiology, Vienna, AUSTRIA	H. Cross	ASS
Sanofi-Synthelabo, Montpellier, FRANCIA	G. Fabre	DIR
Glaxo Wellcome SmithKline SpA Verona, ITALIA	G. Dal Negro	DIR

1.1.5 - Studio del metabolismo e della tossicità di supplementi di ferro in cellule intestinali umane in coltura.

M.L. Scarino, Y. Sambuy

Obiettivi

1) Identificare i possibili effetti tossici di diversi supplementi orali di ferro prescritti durante la gravidanza determinando nelle cellule Caco-2:

a) le variazioni della permeabilità del monostrato cellulare

1- la risposta allo stress ossidativo dopo trattamento con composti del Fe(II) e del Fe(III)

2) Studiare le interazioni ferro-rame nel trasporto intestinale di ferro

3) Studiare le modificazioni che si verificano durante la gravidanza nel metabolismo intestinale del ferro trattando le cellule Caco-2 con ormoni steroidei e/o differenziandole in siero umano normale e di donne gravide ed analizzando:

a) La captazione ed il trasporto di Fe(II) e Fe(III)

• L'espressione di geni coinvolti nel metabolismo intestinale del ferro

Descrizione dell'attività

In una prima seria di esperimenti volti ad indagare le relazioni tra metabolismo del ferro e del rame a livello intestnale, cellule Caco-2 differenziate su filtro sono state trattate con due differenti protocolli di carico di rame: acuto ($CuCl_2$ 10μM durante le ultime 18 ore prima dell'esperimento) oppure cronico (1μM $CuCl_2$ per 16 od 8 giorni prima del completo differenziamento, al giorno 20 dalla semina). Le cellule venivano trattate in mezzo di coltura completo in assenza di effetti citotossici, come rilevato attaverso la misura della resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER). Il contenuto intracellulare di rame (misurato tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico) era aumentato, rispetto ai controlli (cresciuti in mezzo completo senza supplemento di rame), di 4 volte nel carico acuto, di 8 volte nel carico cronico dopo 8 giorni e di 23 volte nel carico cronico dopo 16 giorni. Al contrario il contenuto intracellulare di ferro rimaneva inalterato dopo tutti i trattamenticon rame. La captazione di ferro(II) da parte della membrana apicale delle cellule Caco-2 non era modificata in cellule caricate con rame, mentre il suo efflusso dallla membrana basolaterale era significativamente aumentato rispetto ai controlli nelle cellule sottoposte a carico cronico.

Esperimenti di espressione genica (ibridazioni Northern) non hanno dimostrato un aumento dell' RNA messaggero nelle cellule trattate con rame rispetto ai controlli sia del trasportatore apicale di ferro(II) DMT1 che del trasportatore basolaterale di ferro Ireg-1. Anche gli RNA messaggeri della ferro-ossidasi intestinale efestina e del recettore della transferrina non risultavano modificati dai trattamenti con rame. Al contrario il messaggero della metallotioneina (MT), proteina capace di accumulare grandi quantità di rame intracellularmente, era significativamente aumentato sia dopo il carico acuto che dopo 16 giorni di carico cronico. Anche se il suo messaggero rimaneva invariato, tuttavia la quantità totale della proteina del trasportatore Ireg-1, misurata attraverso esperimenti di Western blotting, risultava aumentata rispetto ai controlli in cellule trattate cronicamente con rame per 8 giorni, fornendo una spiegazione per l'aumento di efflusso basolaterale di ferro riscontrato nelle medesime condizioni sperimentali.

In una seconda serie di esperimenti, volti a studiare il controllo placentare dell'assorbimeto intestinale di ferro durante la gravidanza, cellule Caco-2 sono state trattate con l'ormone leptina, che è secreto dagli adipociti ma anche dalla placenta e che è in grado di regolare il metabolismo e l'assorbimento intestinale di lipidi e peptidi. Le cellule Caco-2 sono state cresciute:

1) In presenza di 10, 50 e 100nM leptina (trattamento cronico) dal giorno 3 al giorno 18 dalla semina, e il differenziamento cellulare è stato misurato rilevando i valori di TEER ed il