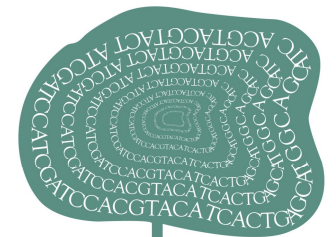




Culturas celulares para estudos de biodisponibilidade de nutrientes

Marta Wilton de Vasconcelos

23-12-2009



Plan|ech



Programas de investigação

1. Regulação nutricional do crescimento
2. Diferenciação e desenvolvimento celular
3. Interações nutrientes - genes
4. Metabolismo intermediário dos macro nutrientes
5. Absorção e metabolismo de nutrientes
6. Obesidade infantil
7. Comportamentos alimentares das crianças
8. Nutrição durante a gravidez e aleitamento
9. Fito nutrientes, bioquímica, fisiologia, transporte

● ● ● | UCP-ESB

Áreas e tópicos:

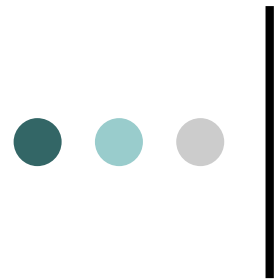
- **Alimentos:** mais seguros, mais saudáveis, mais nutritivos e mais competitivos.
- **Ambiente:** abordagens inovadoras para os desafios ambientais e de sustentabilidade



Subnutrição



- Estima-se que 2 mil milhões de pessoas sofram de subnutrição em Fe, Zn, iodo, e vitamina A



Subnutrição

- **Anualmente:**

- Morrem 1 milhão de crianças < 5 anos
- Morrem 60,000 mulheres após parto
- Nascem 19 milhões de crianças com deficiências cognitivas ou físicas

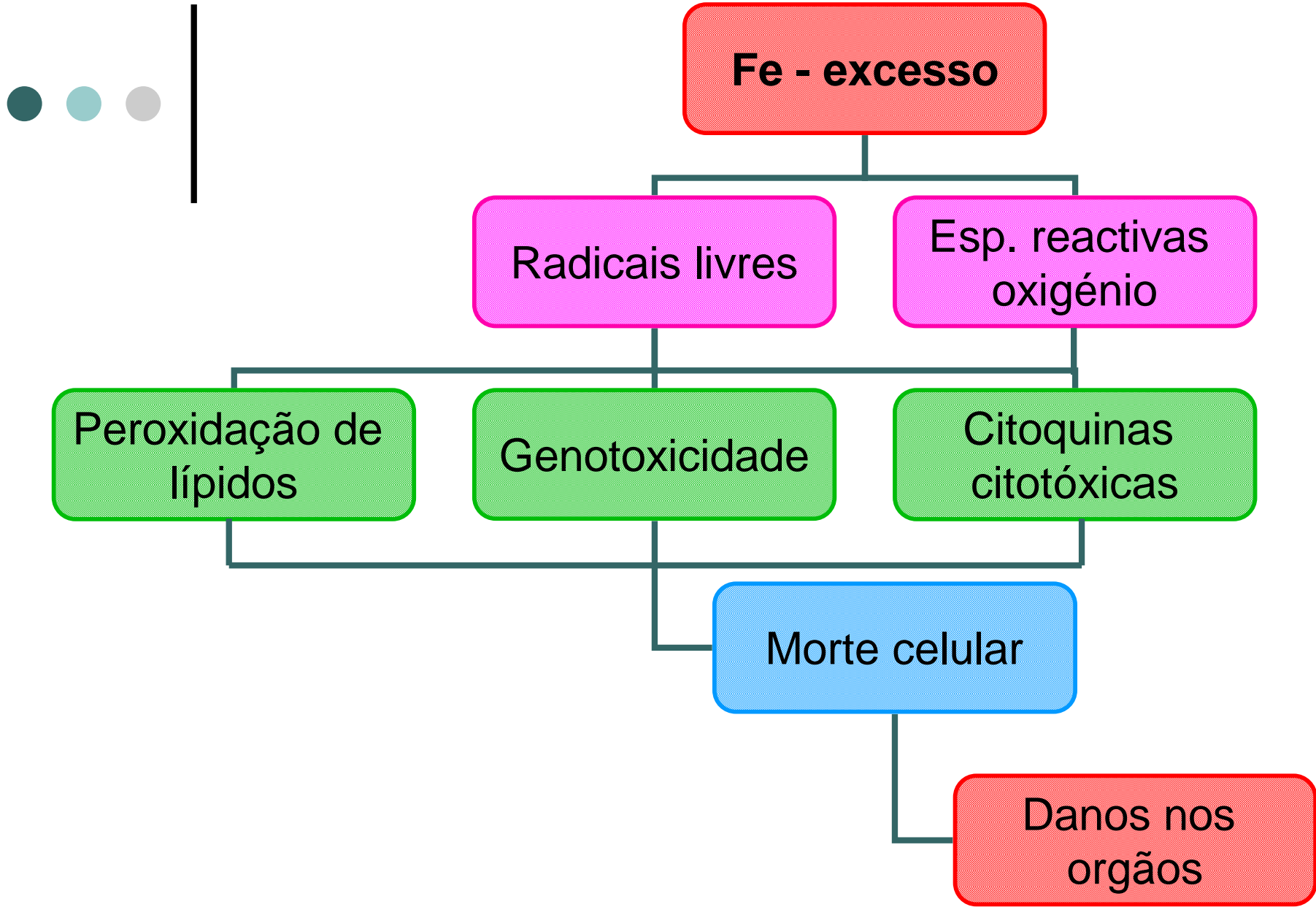
- **Ferro:** maior carência nutricional mundial, levando a

- Debilitação da saúde em 500 mil milhões de mulheres



Anemia de Fe

- o Fadiga constante
- o Perda de apetite
- o Falta de ar
- o Palidez da face, gengivas, língua, unhas, ou no interior das pálpebras
- o Redução das capacidades cognitivas
- o Palpitações





- o 3,5 g Fe
- o 10-20 mg Fe
- o 10% absorção
- o 75% Hb, 10-20% armazém
- o Perdas de ferro?

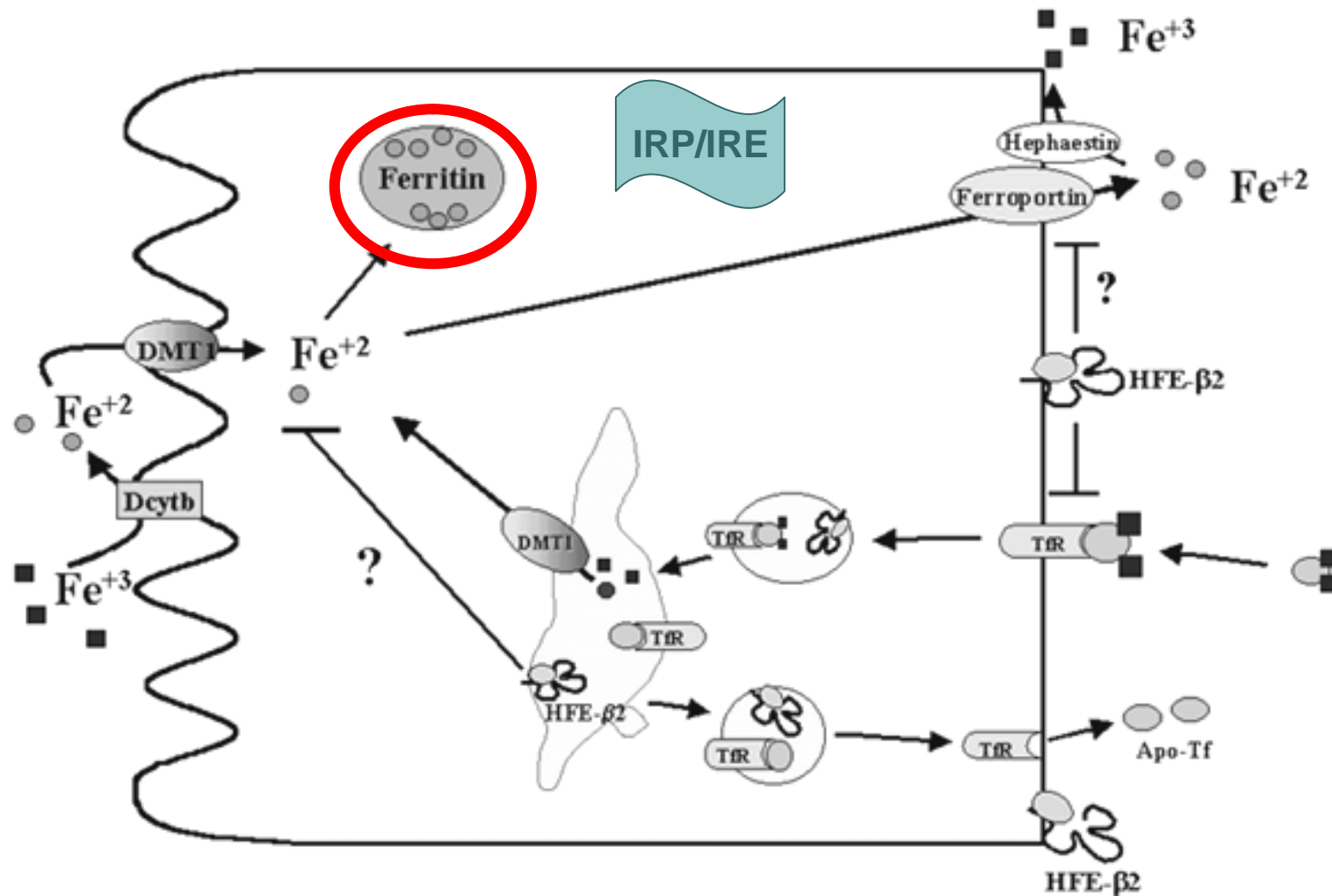




Ferro



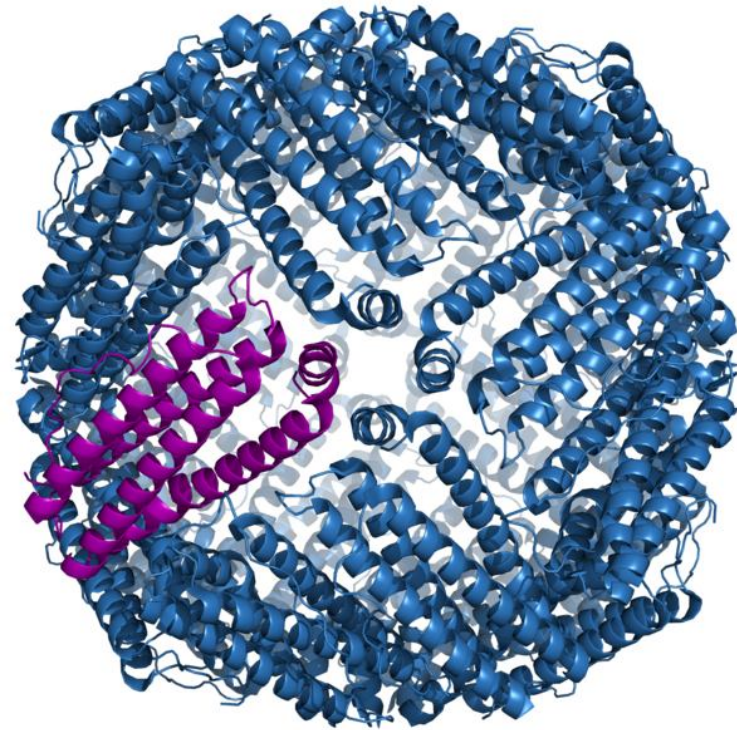
Absorção de Fe



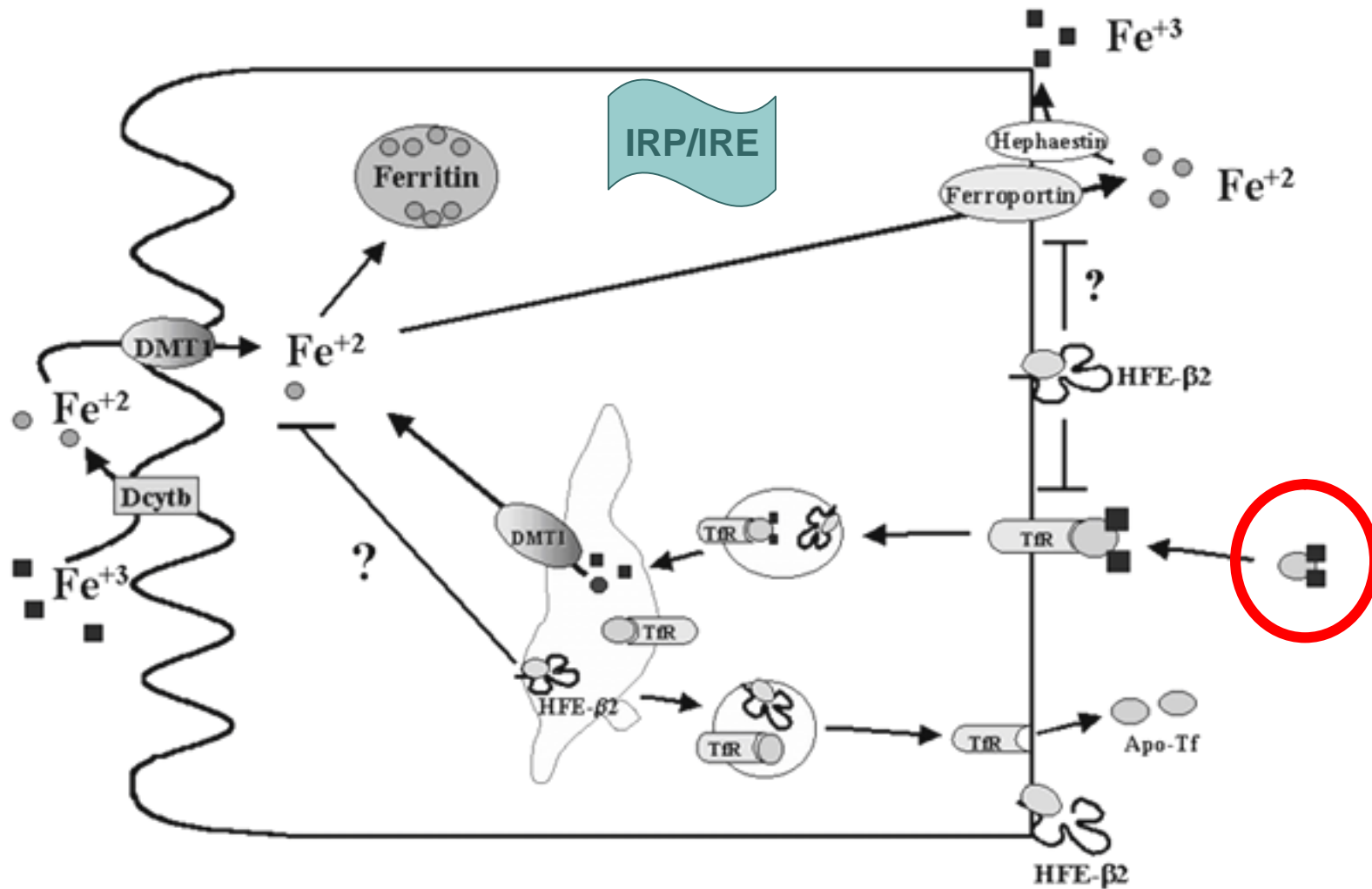


Ferritina

- 450 kDa
- Acumula Fe e liberta de forma controlada
- Proteína globular com 24 subunidades
- Procariotas e eucariotas
- Apoferritina
- 4500 átomos de Fe^{3+}

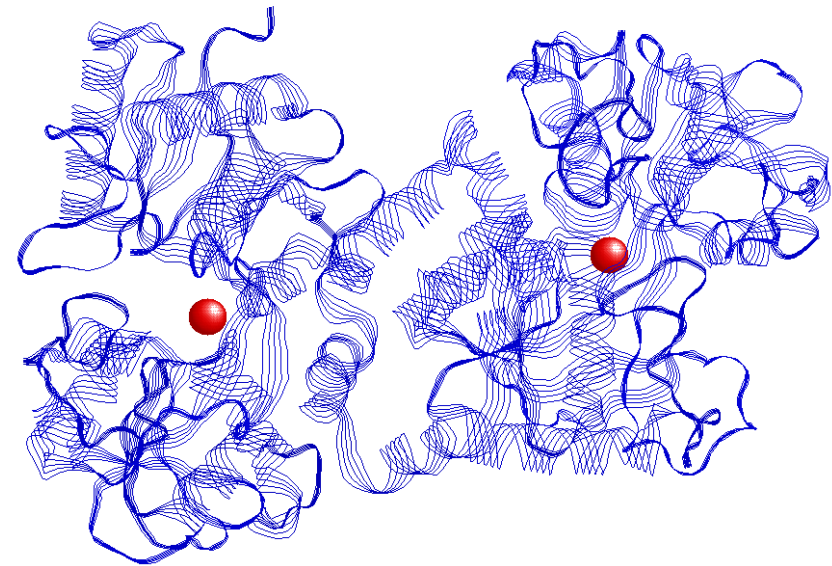


Absorção de Fe

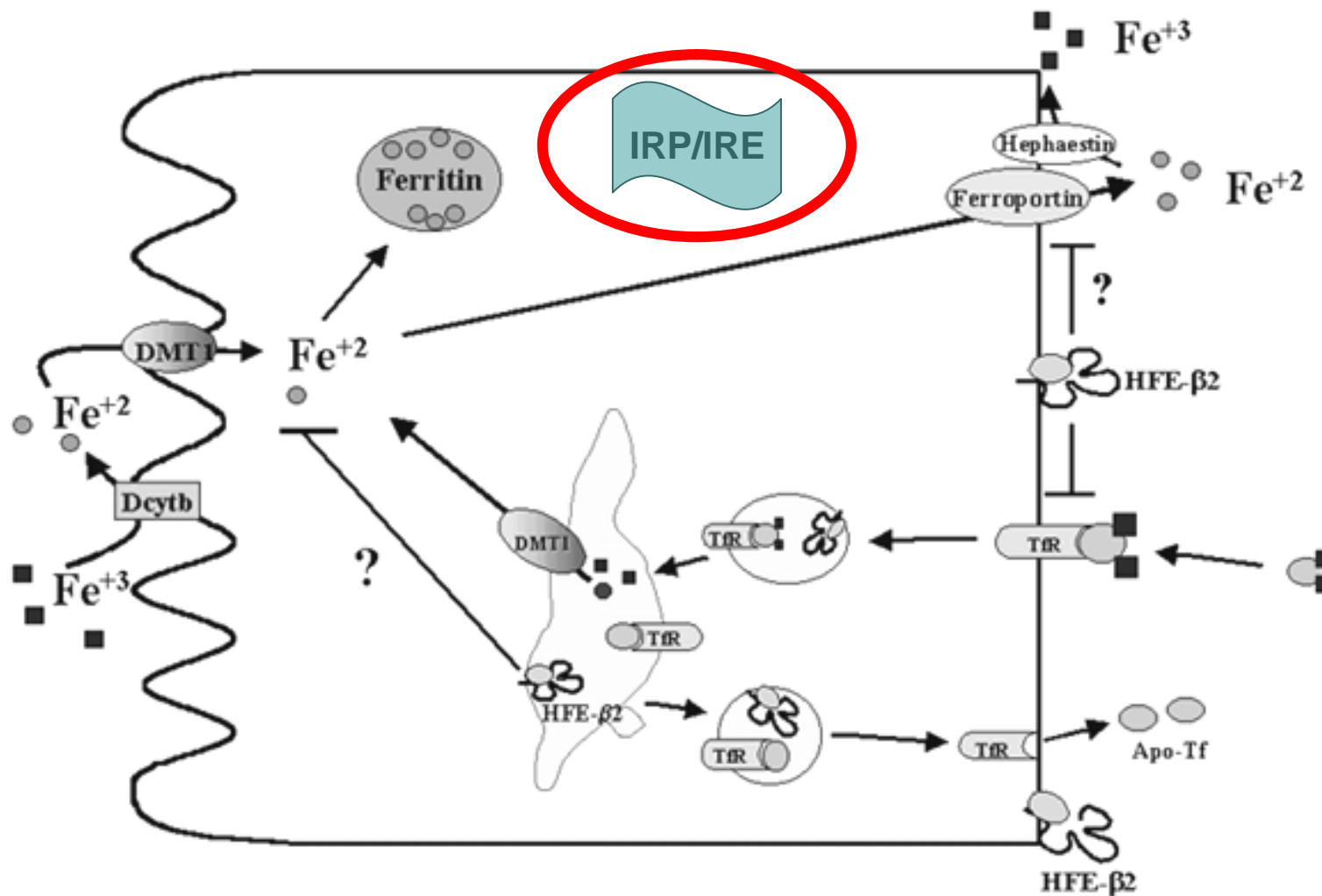


● ● ● | Transferrina

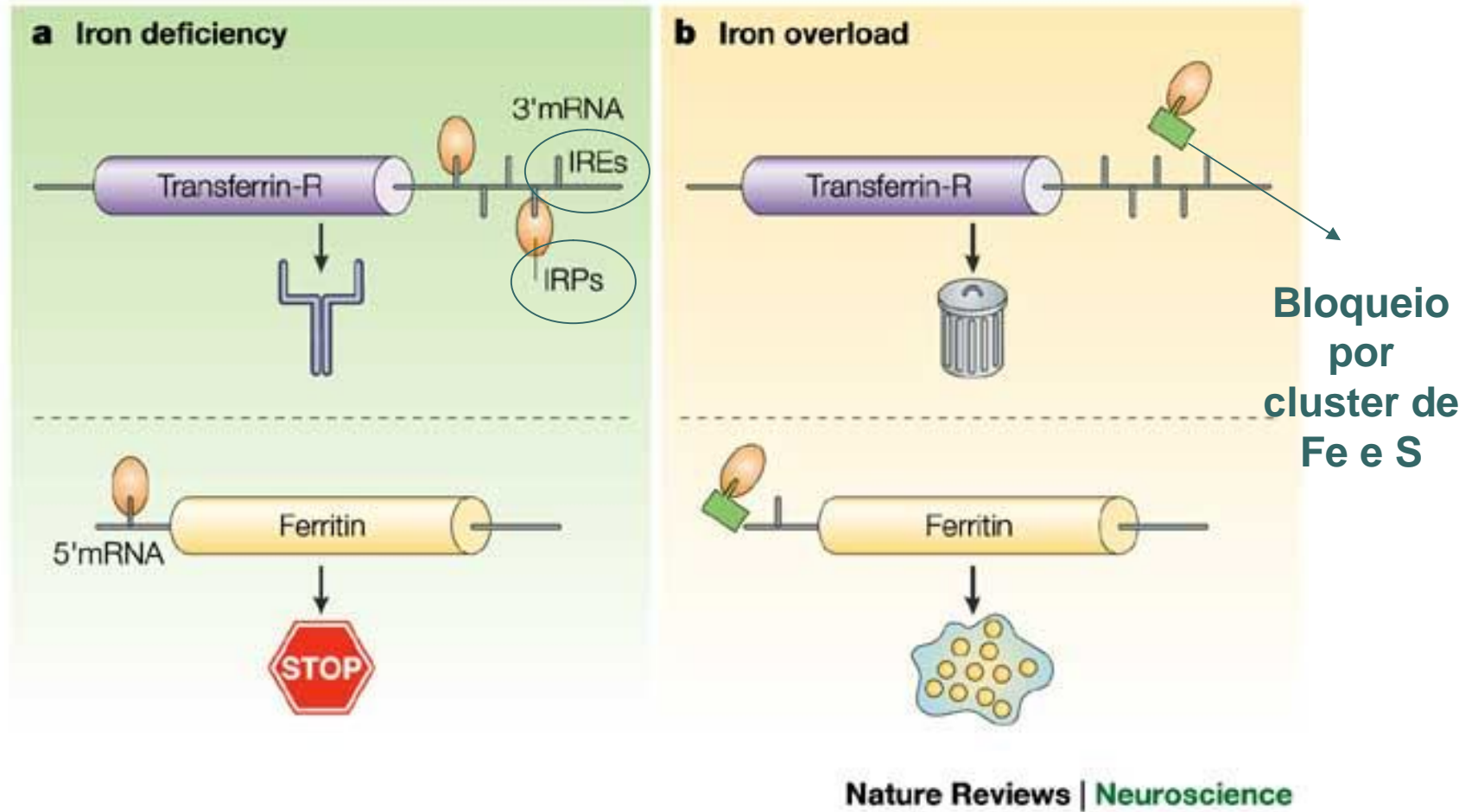
- Circulação → órgãos
- 20-45% saturada
- 2 átomos de Fe
- Homeostasia altamente regulada



Absorção de Fe



IRP/IRE





Biodisponibilidade Mineral (definição)

A proporção do mineral ingerido que está disponível para processos metabólicos.



Quais os factores que afectam a biodisponibilidade?

- **Aumentada por:**

- Carne (vermelha, branca e peixe); (o chamado factor carne)
- Vitamina C
- Certos péptidos presentes nos alimentos

- **Diminuída por:**

- Fitatos (milho, trigo, cevada, soja, arroz integral)
- Fosfatos
- Polifenóis (chá, vegetais)
- Ácido oxálico (espinafre)
- Fibra
- Cálcio




Hipótese

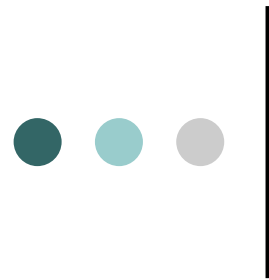
- Adicionando vitaminas e minerais a alimentos “base”, ou aumentando a sua biodisponibilidade podemos melhorar significativamente a saúde humana





Medição de biodisponibilidade de Fe

- *In vivo*
 - Humanos
 - Animal
- *In vitro*
 - Solubilidade
 - Diálise
 - Pedacos de mucosa
 - Vesículas membranares
 - Pregas intestinais
 - Linhas celulares intestinais
 - Células de Caco-2 

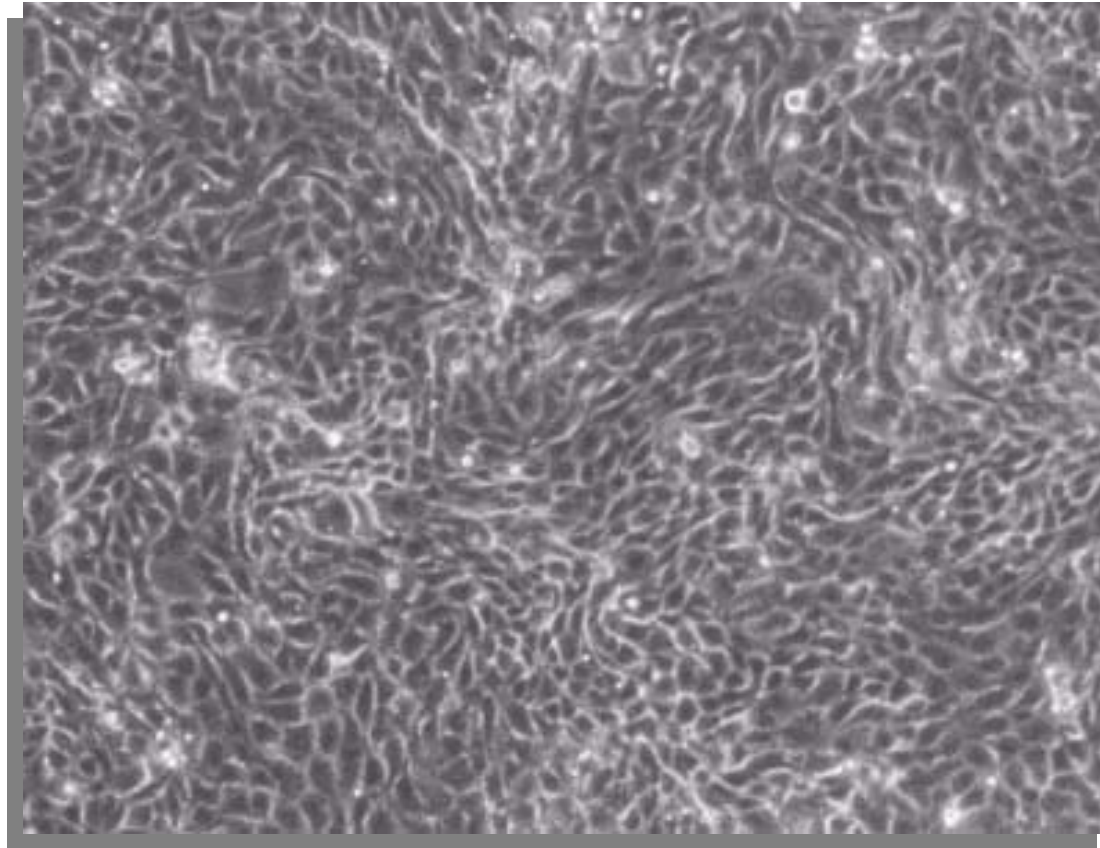


Caco-2: o que são?

- Linha celular humana de adenocarcinoma
- Isolada em 1979
- Pertencem a:
 - Homem
 - Caucasiano
 - 72 anos
- Exibem características de células intestinais:
 - Formam monocamadas em cultura
 - Contêm enzimas brush border
 - Transportam proteínas e minerais



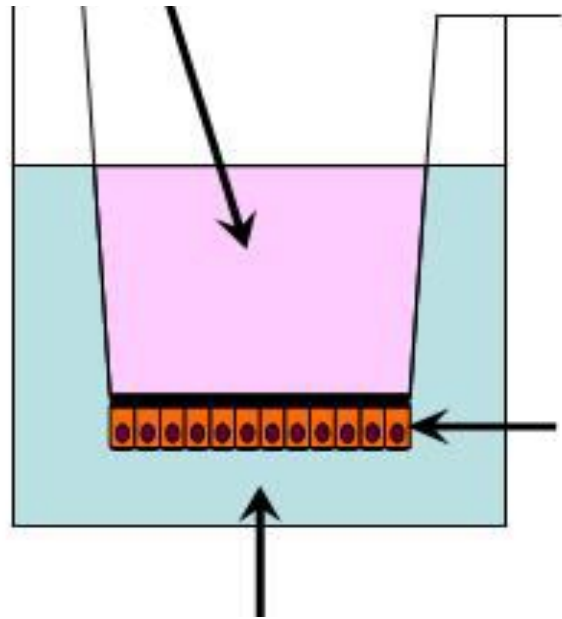
Caco-2 : ~200,000 células/cm²





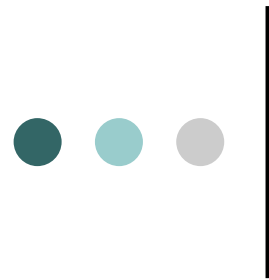
Caco-2

Lado
apical



Monocamada

Lado
basolateral



Caco-2 e absorção de Fe

- As células regulam a absorção de Fe como resposta à quantidade de Fe disponível no meio
- O ácido ascórbico e a carne aumentam a quantidade de Fe no meio
- O ácido ascórbico e a carne aumentam a absorção de Fe pelas células
- O ácido fítico (fitato) e os polifenóis inibem a absorção de Fe



O modelo e o uptake de Fe

Vários estudos apontam repetidamente que qualitativamente os resultados dos estudos com cultura celular são concordantes com os estudos *in vivo* em humanos

(Glahn et al., 1996; Gangloff et al., 1996; García et al., 1996; Au and Reddy, 2000)



Ferritina como índice de biodisponibilidade

- A quantidade de ferritina produzida é proporcional à quantidade de Fe absorvido pelas células
- Quanto mais Fe é absorvido, mais biodisponível está o mineral no alimento em questão



Trigo



Factor carne



Método culinário



Probióticos



Milho

Suplementos de ferro e fortificantes

Ingestão In vitrol
Modelo celular Caco-2
APLICAÇÕES



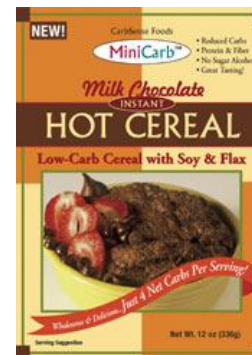
Arroz

Sumos de fruta



Leite humano e em pó

Cereais



Exemplo 1: Gates Grand Challenge in Global Health



Grand Challenges in Global Health

News & Events | Knowledge Center | Email Updates

Search

Home | About the Grand Challenges | Grant Opportunities | Goals | Where We Work | Projects by Technology | Projects by Disease

GOAL 4: IMPROVE NUTRITION

"Humanity's greatest advances are not in its discoveries—but in how those discoveries are applied to reduce inequity." **BILL GATES**

- Learn More About Grand Challenges Projects
- Learn More About Grand Challenges Explorations

News & Events

- October 22, 2008 Gates Foundation Invests in 104 Novel Ideas for Global Health
- Applications for Grand Challenges Explorations Round 3 will be Accepted Beginning March 31, 2009
- In Search of New Ideas for Global Health
- See All News & Events

Email Updates

- Sign up to receive news and announcements by email

Project Spotlight

Needle Free Vaccination Via Nanoparticle Aerosols

This multidisciplinary team is developing vaccines for TB and diphtheria in the form of novel porous nanoparticle aggregate (PNAP) aerosols that can be inhaled.

Find Out More...

Home | Site Map | Contact Us | Privacy Policy | Terms of Use

© 2003-2008. Grand Challenges in Global Health. All Rights Reserved.



Cooperação





Objectivos



- **Melhorar vacinas existentes**
- **Criar novas vacinas**
- **Melhorar a nutrição**
 - Criar plantas com todos os nutrientes necessários, e com elevada biodisponibilidade
- **Reduzir resistência a drogas**
- **Curar infecções**
- **Avaliar o status da saúde mundial**

● ● ● | Objectivos

- Transformar arroz para melhorar o teor em Vitamina A, Vitamina E, e biodisponibilidade de Fe e Zn
- Melhorar cassava
- Melhorar sorgo para áreas tropicais africanas
- Optimização da biodisponibilidade de nutrientes em banana



● ● ● | Objectivos



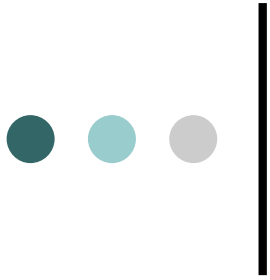
- Concentrar múltiplos micronutrientes e factores de biodisponibilidade no arroz dourado
- Identificar as bases genéticas e bioquímicas da biodisponibilidade
- Avaliar a biodisponibilidade de Fe em sujeitos que consumiram arroz dourado
- Melhorar o teor proteico em lisina em variedades de arroz
- Introduzir novas características favoráveis em arroz transgénico



Estudos de biodisponibilidade

- Biodisponibilidade

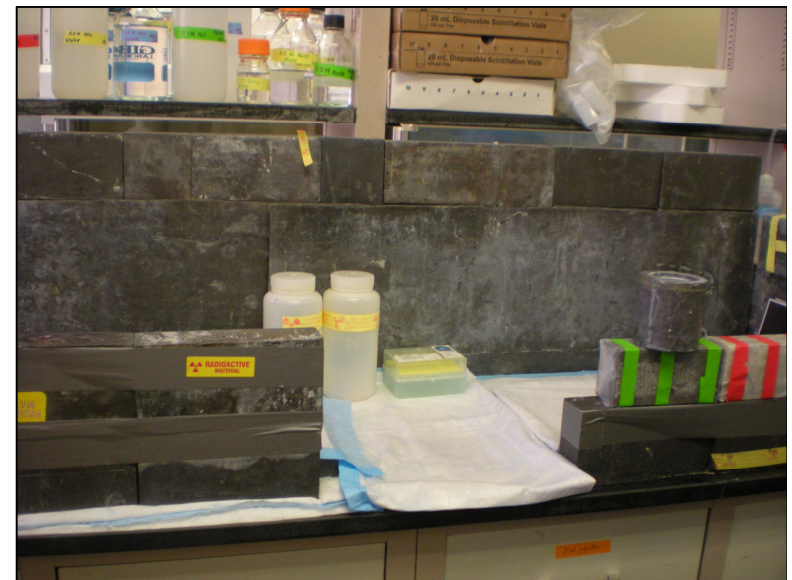
- 1) Detectar factores que aumentam a biodisponibilidade
- 2) Detectar alimentos que por si só ofereçam maior biodisponibilidade



- Utilizando RILs de *Arabidopsis* podemos detectar linhas que possuem factores que aumentam ou diminuem a biodisponibilidade

● ● ● | Biodisponibilidade

- Fe : produção de *ferritina*
- Ca: Ca^{45} (emissor gama, protecção de chumbo)
- Zn: Zn^{65}



- ● ● | Material



- RILs: Recombinant Inbred Lines
- *Arabidopsis thaliana*
- Marcadores moleculares disponíveis
- Células Caco-2
- Radioisótopos para Ca (Ca^{45}) e Zn (Zn^{55})
- Teste de ferritina (Fe)
- Análise de micronutrientes por ICP



RILs

Variedade 1 X Variedade 2

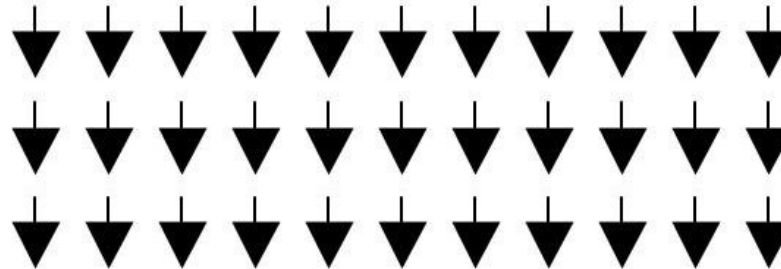


F1



F2

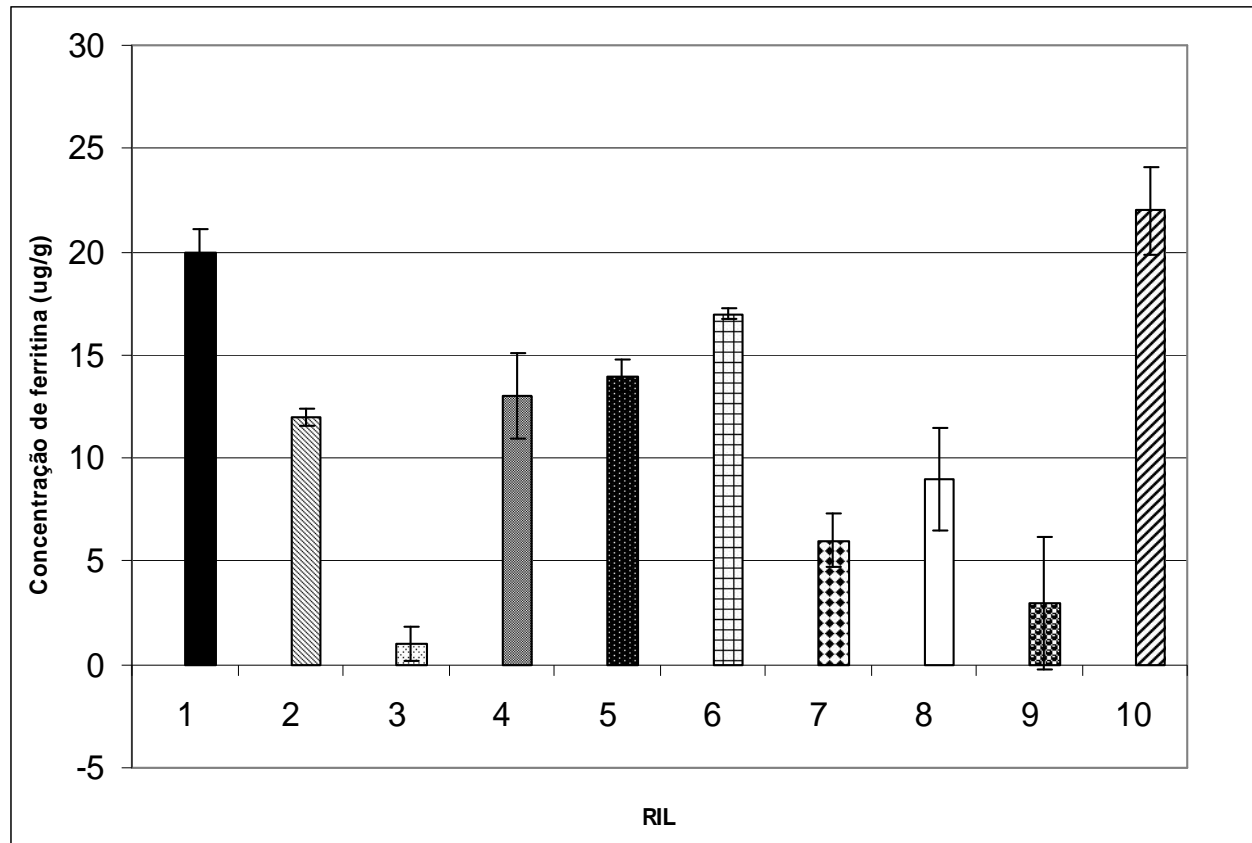
10-20 gerações de
autocruzamentos



Recombinat inbred lines com combinações
aleatórias dos genomas parentais



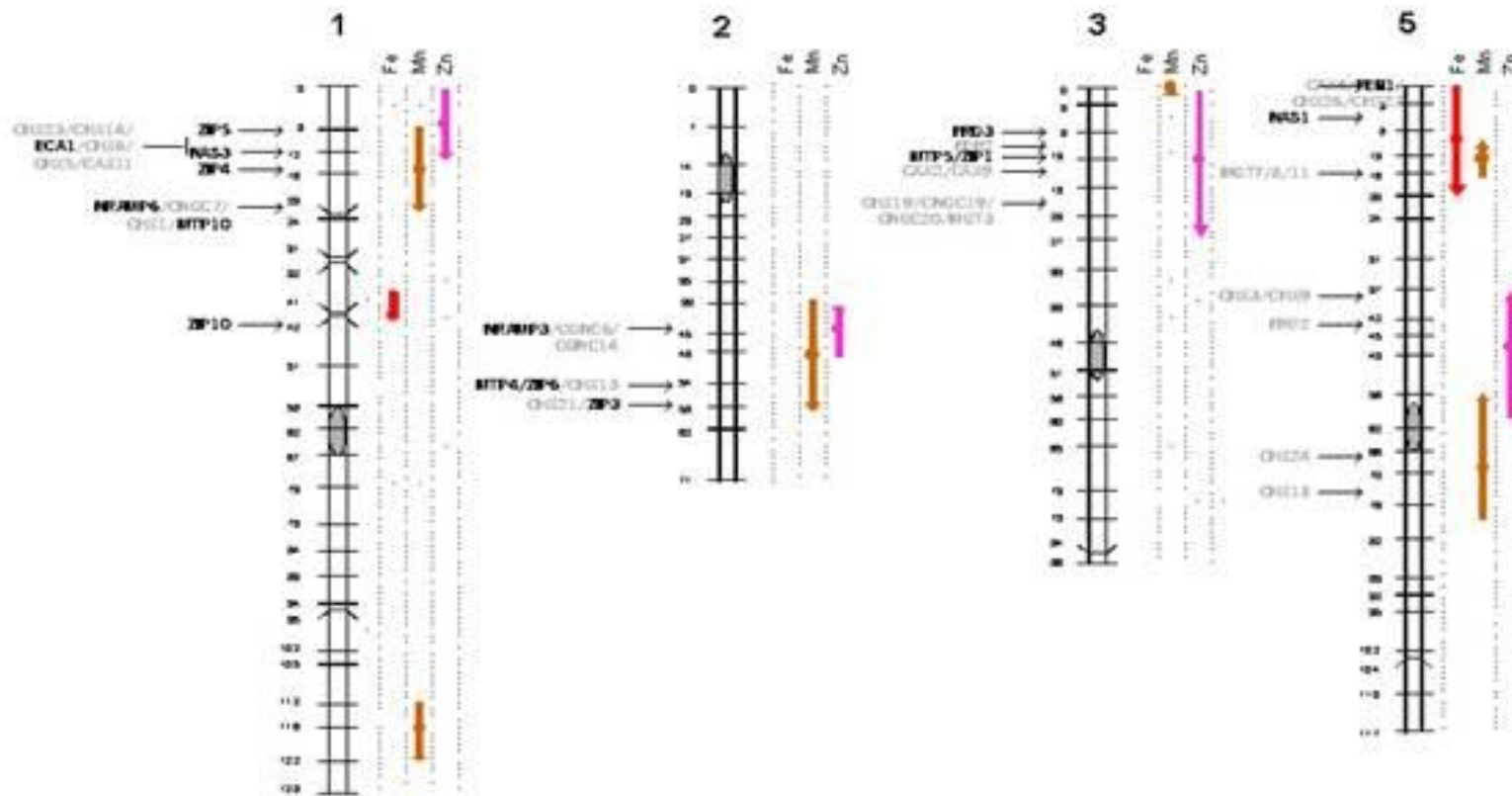
Concentração de ferritina





Análise de QTLs

- QTL: quantitative trait loci





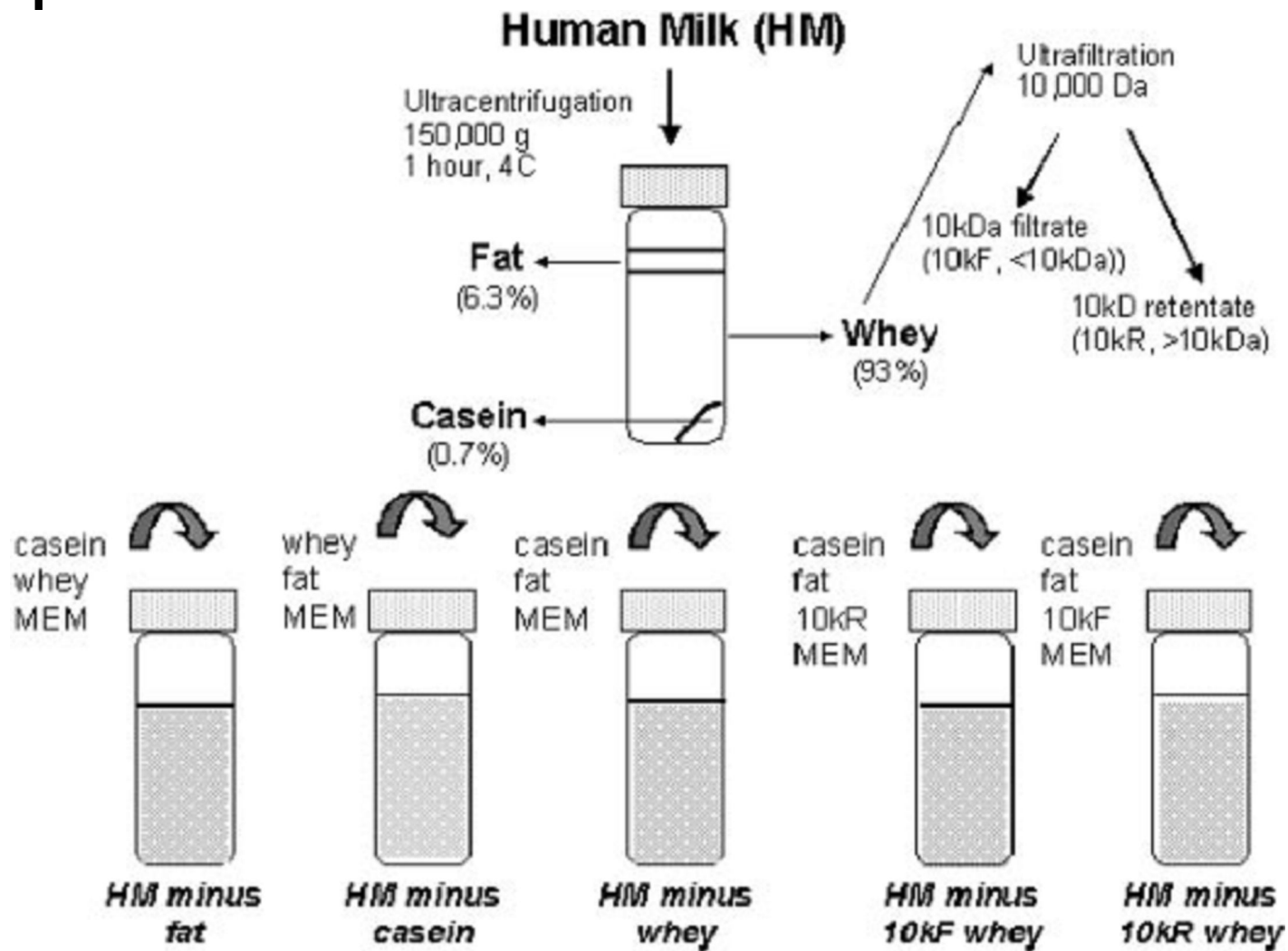
Ex2: Biodisponibilidade de Fe em sumos de fruta

- Sumos: pêra, maçã, uva vermelha, uva branca, ameixa, toranja, laranja
- Contêm factores que diminuem (polifenóis) e aumentam (ácido ascórbico) a biodisponibilidade
- Adicionou-se FeCl_3 ou fórmula infantil
- Resultados: sumo de uva vermelha ou ameixa inibem absorção Fe; os outros aumentaram a absorção de Fe



Ex3: Biodisponibilidade de Fe em leite humano

- O Fe no leite humano é mais biodisponível do que no leite da vaca. Porquê?
- Leite: separado em lípidos, caseína e soro (>10KDa<)
- Sulfato de ferro
- Separados em dois lotes: com ou sem digestão *in vitro*



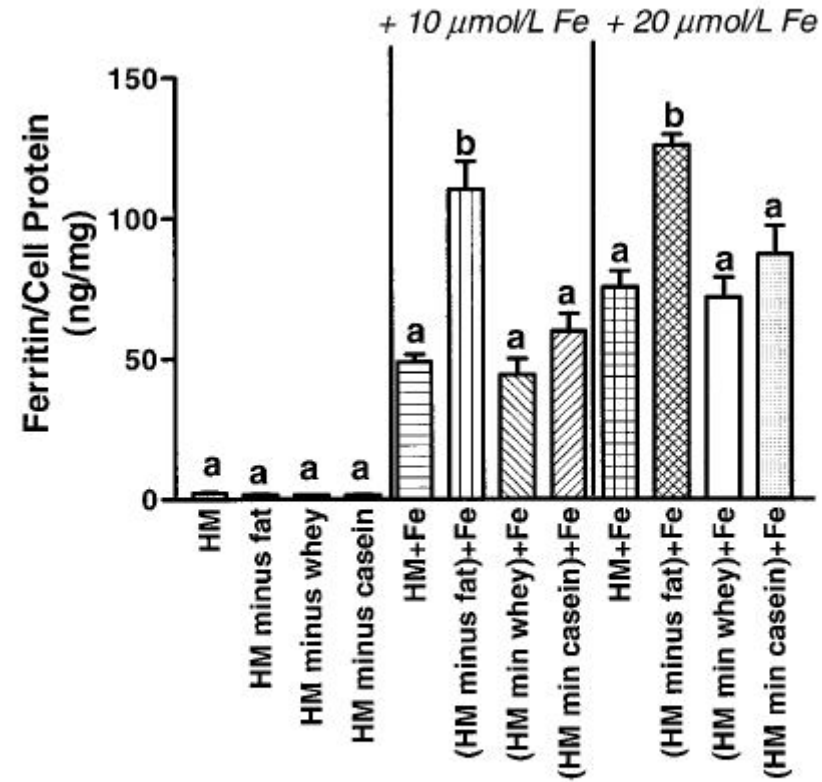


FIGURE 2 Ferritin levels of Caco-2 cells treated with human milk (HM) fractions with 0, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ Fe added as FeSO_4 . Bars are means \pm SEM, $n = 5$. Means for each iron concentration (0, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$) without a common letter differ; $P < 0.05$.

Etcheverry et al. (2003) Human milk enhances Fe uptake by caco-2 cells, JN

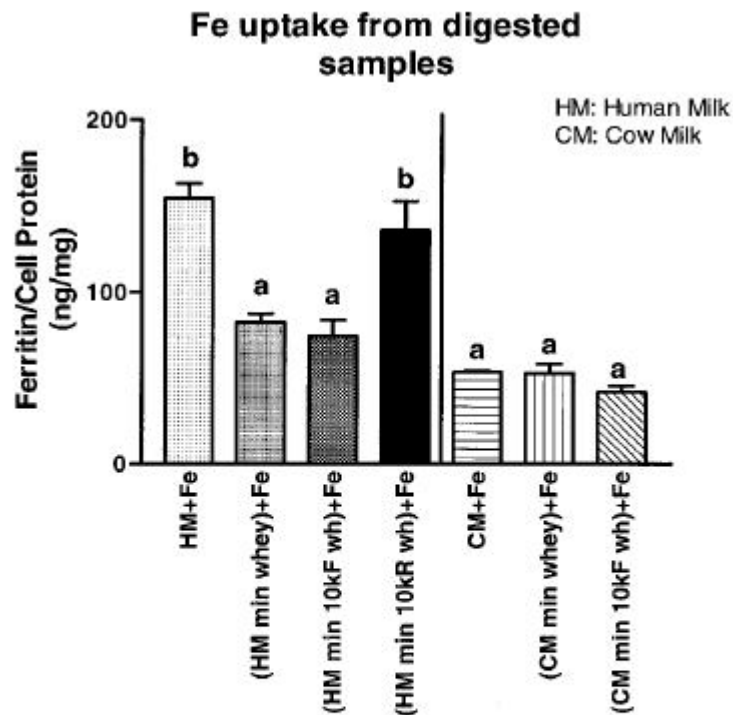


FIGURE 5 Ferritin levels of Caco-2 cells treated with digested human milk (HM) and cow's milk (CM) whey fractions, including 10-kDa filtrate (10kF; components < 10 kDa) and retentate (10kR; component > 10 kDa) fractions. All test fractions were supplemented with iron (10 $\mu\text{mol/L}$ as FeSO_4) and subjected to in vitro digestion/Caco-2 cell model. Bars are means \pm SEM, $n = 5$. Means without a common letter differ; $P < 0.05$.

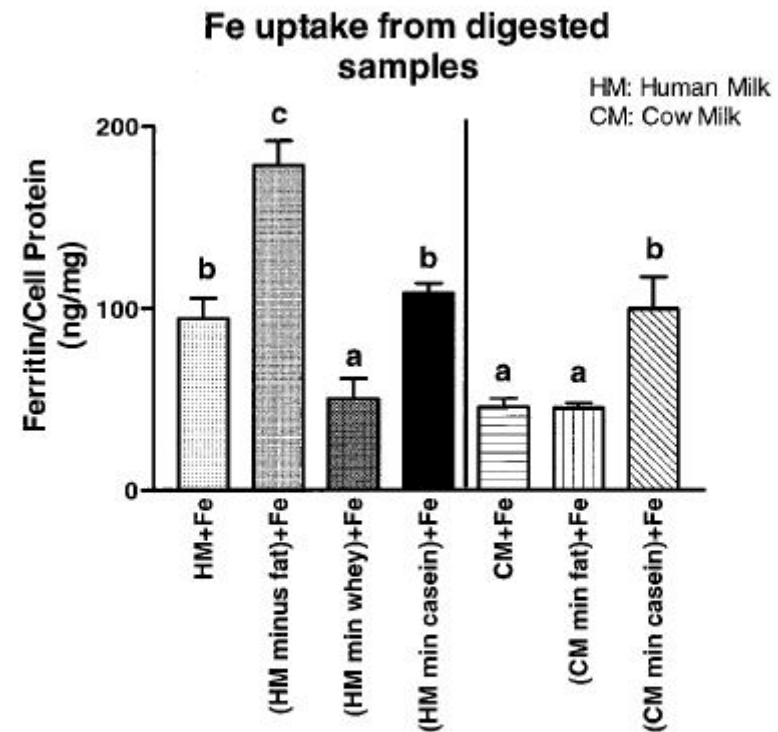
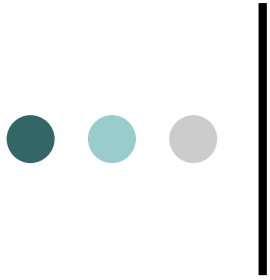
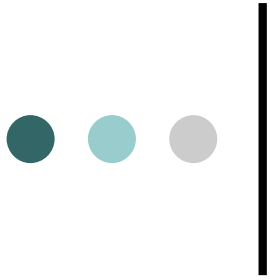


FIGURE 4 Ferritin levels of Caco-2 cells treated with digested human milk (HM) and cow's milk (CM) fractions. All test fractions were supplemented with iron (10 $\mu\text{mol/L}$ as FeSO_4) and subjected to in vitro digestion/Caco-2 cell model. Bars are means \pm SEM, $n = 5$. Means without a common letter differ; $P < 0.05$.

Etcheverry et al. (2003) Human milk enhances Fe uptake by caco-2 cells, JN



- Remoção de lípidos aumentou a absorção de Fe em leite digerido e não digerido
- Remoção de soro diminuiu a absorção de Fe em 48% no leite humano digerido
- Ao remover a fracção menor de 10KDa do leite humano reduziu a síntese de ferritina em 60%



Considerações gerais para trabalhar com Caco-2

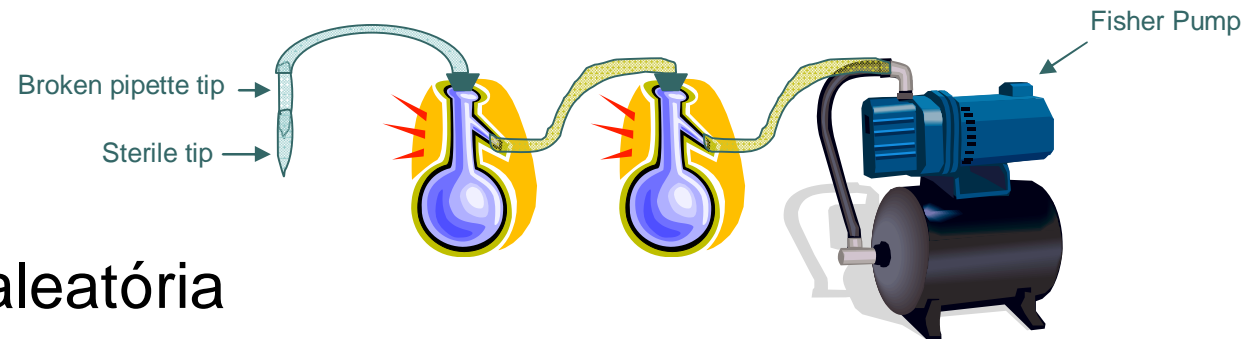
● ● ● | Considerações gerais

- Armazenamento
- 14 d
- 1^a vez: 1 mês.
- Seeding-passagem.

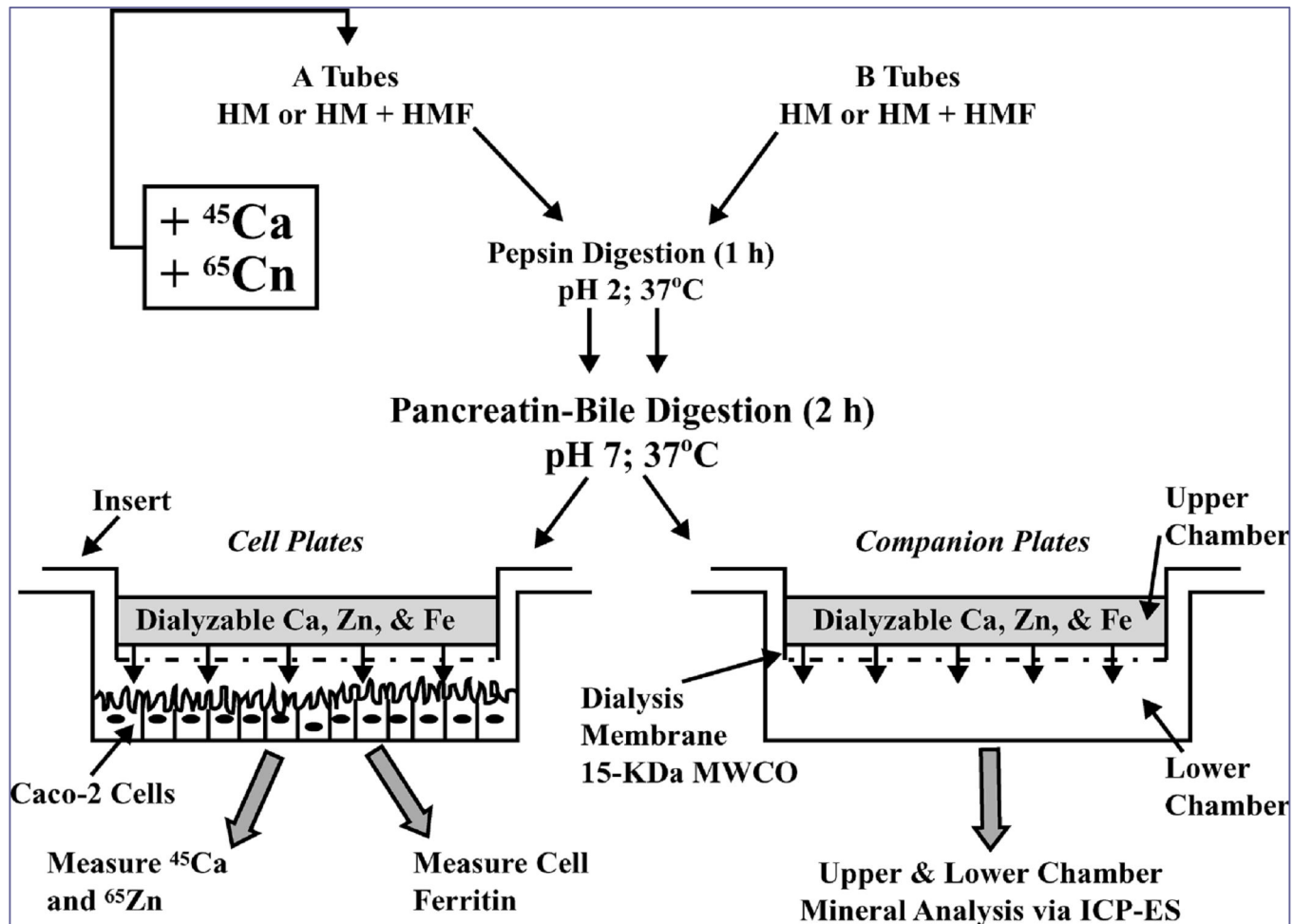


Considerações gerais

1. Câmara de fluxo laminar
2. Luvas protectoras estéreis e lavadas com álcool
3. Tip de sucção em lexívia
4. pH 7
5. Meio DMEM
6. Distribuição aleatória

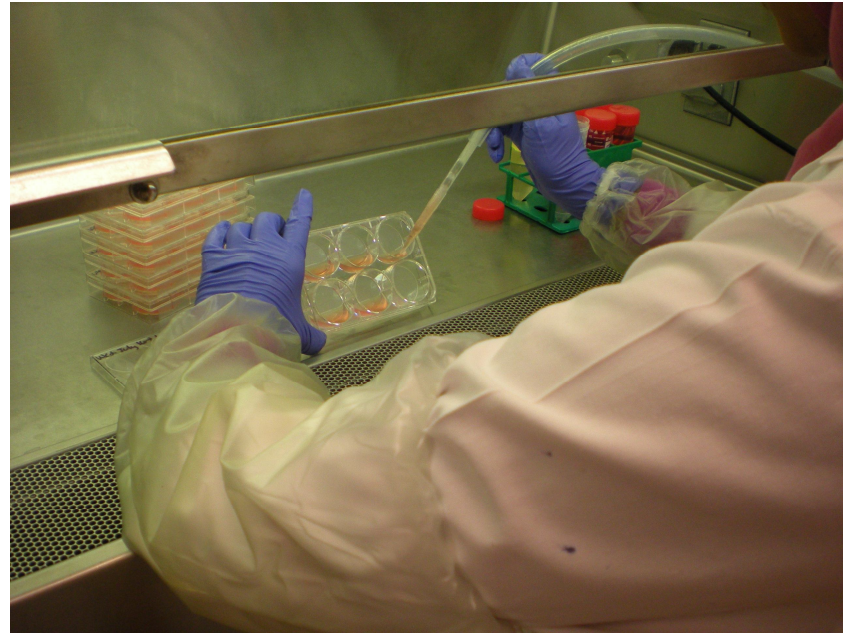


Digestão *in vitro* em Caco-2



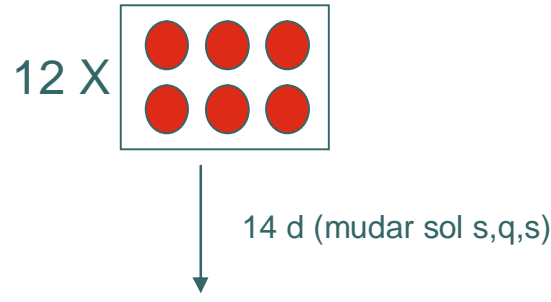
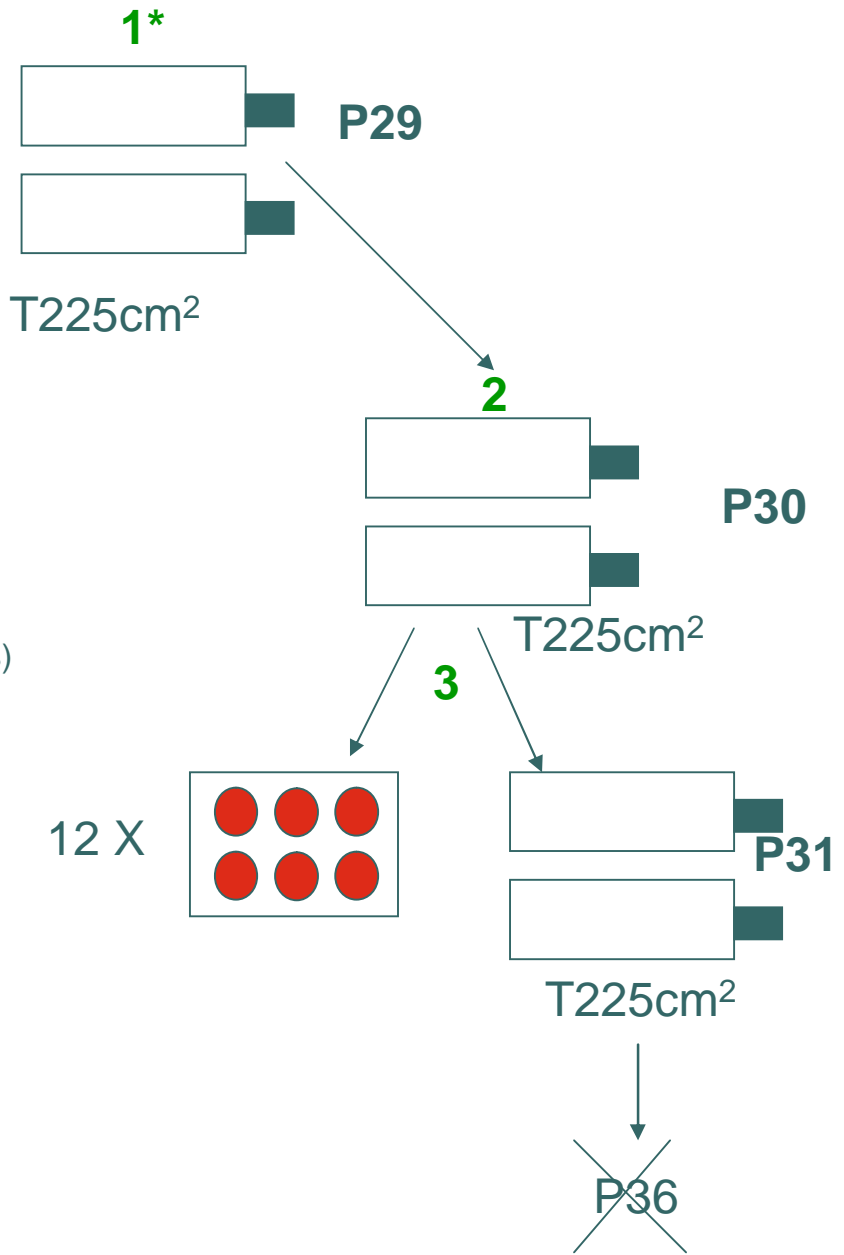


Seeding





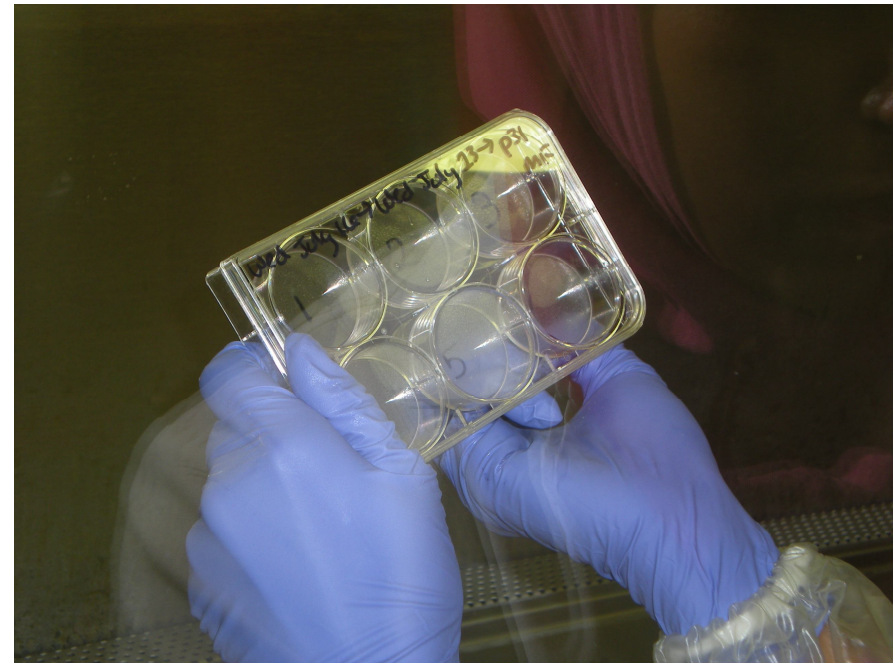
Seeding: Quar, Sex



Experi (T, Q)
Se seed Quar - exp ter
Se seed Sex-exp quin

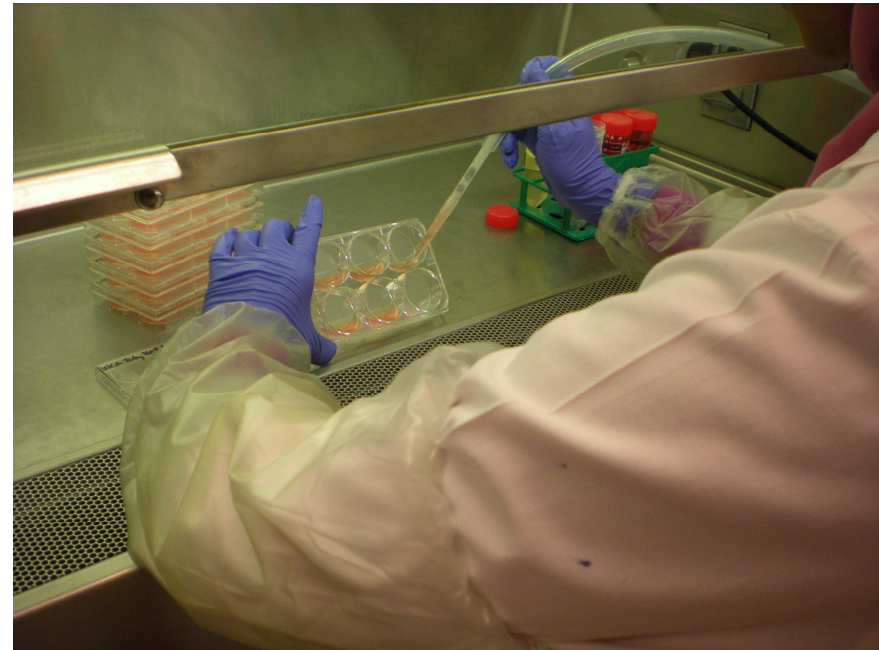


Identificação





Alimentar as células

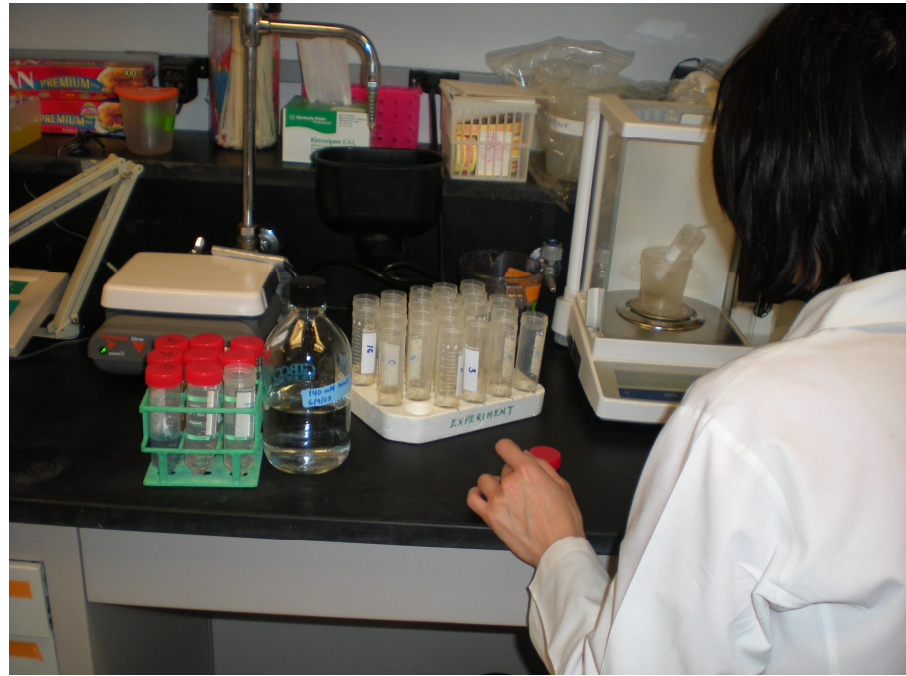




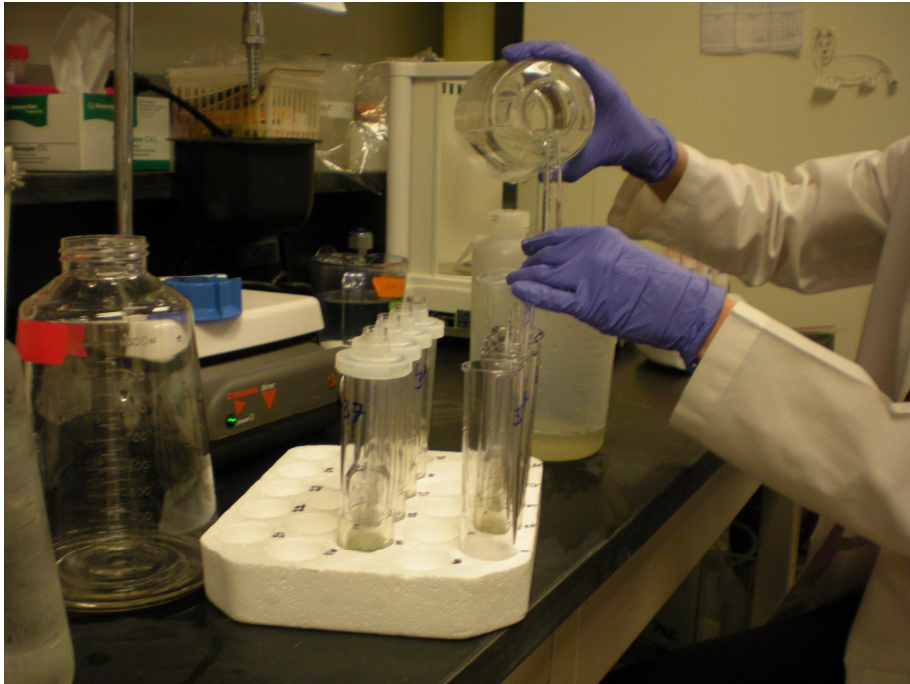
Incubação



• • • | Digestão



● ● ● | Filtração





Trabalhos em curso

Biodisponibilidade de micronutrientes

- Expressão genética
- Fitatos e fósforo total
- Micronutrientes
- Absorção por Caco-2

Eficácia de acção de probióticos no leite

- Adesibilidade e colonização
- Actividade redutiva hipertensora (BSH, CLA isomerase)
- Detecção de genes de colonização

● ● ● | Agradecimientos

- FCT
- ESB/UCP
- Ana Gomes (ESB)
- Paz Etcheverry (Baylor College)
- Grupo Plantech





Muito
obrigada
pela vossa
atencao!

