

ANEXO I PROPOSTA DE PROXECTOS DE INVESTIGACIÓN STEMBACH

| Dirección do proxecto | |
|-------------------------------------------------|-----------------------|
| Nome: Rosa Pérez Gregorio | |
| Enderezo electrónico: mariarosa.perez@uvigo.gal | Teléfono: 988 387 061 |
| Co-dirección do proxecto | |
| Nome: Elena Martínez Carballo | |
| Enderezo electrónico: elena.martinez@uvigo.gal | Teléfono: 988 387 067 |
| Bienio | 2022/2024 |
| Número de participantes (máx. 4) | 4 |

Título

Influencia do millo corvo na resposta inmunitaria ó trigo na produción de pan

Resumo

A enfermidade celíaca caracterízase comunmente como unha afección crónica do sistema inmunolóxico que se desenvolve debido á presenza de glute, un conxunto de proteínas (gliadinas e gluteninas) presentes en cereais como o trigo, a cebada e a avea. Aínda que a prevalencia desta enfermidade está en aumento, afectando aproximadamente ao 3% da poboación mundial, ata o momento, a única forma efectiva de tratamento é seguir unha dieta libre de glute. Seguir unha dieta libre de glute leva asociada una carga económica e emocional que limita a súa adherencia. Ademais, é preciso destacar que en moitos casos non se consegue restablecer completamente o dano intestinal causado pola doenza debido ao omnipresente uso destas proteínas na industria alimentaria, que favorece por una banda a existencia de contaminacións cruzadas e pola outra á inxesta accidental. Por tanto, é crucial explorar alternativas para prever e controlar esta enfermidade mentres se mellora a calidade de vida dos pacientes. Neste contexto, está a investigarse o potencial dos polifenóis como moduladores da bioaccesibilidade das proteínas do glute como unha opción de control da exposición da poboación a estes antíxenos alimentarios, limitando a prevalencia da doenza.

Este estudo avaliou a capacidade dos polifenóis do millo corvo para modular a liberación de péptidos inmunolóxicos relacionados coa doenza celíaca de tres variedades de fariña autóctona galega (caaveiro, grandal e callobre) durante a dixestión humana do pan. Para lograr este obxectivo, se realizou una dixestión humana in vitro simulada en pan previamente cociñado e contendo fariña de trigo ou fariña de millo e fariña de trigo na súa composición. De seguido, a parte bioaccesible, é dicir, a porción do pan dixerida e capaz de ser absorbida polo organismo, foi extraída, limpa e os péptidos inmunolóxicos foron analizados por espectrometría de masas.

Os resultados deste estudo demostraron a capacidade da fariña de millo corvo, con elevado contido en polifenóis, de reducir significativamente a liberación de péptidos inmunoxénicos durante a simulación in vitro da dixestión humana.

Dun xeito xeral, neste proxecto STEM as alumnas puderon adquirir coñecimentos de química analítica, proteómica, nutrición e inmunoloxía, tomando coñecimento da patofisioloxía da doenza, ferramentas analíticas de análise e deseño de alimentos para una nutrición mais segura.

Obxectivo

O obxectivo científico se centrou en avaliar as implicacións inmunolóxicas do uso de fariña de millo corvo no deseño de pan de trigo. A nivel académico, este proxecto STEM ten como obxetivos enriquecer o coñecemento das alumnas na patofisioloxía de unha doenza con prevalencia en aumento así como por en práctica ferramentas analíticas de uso altamente xeneralizado nas áreas de química dos alimentos e inmunonutrición.

Plan de traballo

O plan de traballo experimental foi levado a cabo nas instalacións do grupo CF1 da Facultade de Ciencias da Universidade de Vigo en catro días en semanas consecutivas. Se realizou una dixestión humana *in vitro* simulada en pan previamente cociñado e contendo fariña de trigo ou fariña de millo e fariña de trigo na súa composición. De seguido, a parte bioaccesible, é dicir, a porción do pan dixerida e capaz de ser absorbida polo organismo, foi extraída, limpa e os péptidos inmunolóxicos foron analizados por espectrometría de masas.

O primeiro día contou cunha presentación introductoria do traballo explicando detalladamente as tarefas a realizar. De seguido, as alumnas prepararon as disolucións necesarias para simular a dixestión *in vitro* do pan (tarefa 1), no segundo día se procedeu á simulación da dixestión humana e no terceiro se prepararon as mostras para análise (tarefa 2 e 3). Finalmente, o cuarto día foi utilizado para tratamento de datos e avaliar os resultados.

Tarefa 1. Dixestión humana *in vitro* das mostras de pan. As mostras de pan foron dixeridas por triplicados seguindo o protocolo estandarizado INFOGEST que simula unha dixestión gastrointestinal estática *in vitro* (Brodkorb et al., 2019). Para levar a cabo a dixestión, o proceso empregado formula realizar tres fases: oral, gástrica e intestinal.

Pesouse 1 gramo de cada tipo de pan en tubos falcon de 15 mL. Para levar a cabo a fase oral requírense 0,8 mL de fluido salivar simulado, 5 μ L de solución de CaCl₂ (preparada xusto antes de comezar a dixestión para evitar a posible precipitación), 0,095 μ L de auga e 0,1 mL dunha solución de amilase salivar a 75 U/mL. Os tubos introducíronse nun incubador IKA KS 4000 durante 5 minutos a 150 rpm.

Para a fase gástrica, preparouse unha solución con fluido gástrico simulado e CaCl₂ para que presentase en cada mostra 1,6 mL e 1 μ L respectivamente e axustouse o pH. Ademais engadiuse 0,1 mL de solución de lipasa a 60 U/mL e 0,1 mL de solución de pepsina a 2000 U/mL a cada mostra. Os tubos introducíronse de novo no incubador 2 horas a 150 rpm.

Para a fase intestinal preparouse unha solución que contiña tripsina (0,2 mL a 100 U/mL), quimiotripsina (0,2 mL a 25 U/mL), lipasa (0,2 mL a 2000 U/mL), amilasa intestinal (0,2 mL a 200 U/mL) e solución de bile a 0,5 mg/mL diluídas en fluido simulado intestinal. Engadíuselle fluido simulado intestinal e CaCl₂ para que presentase en cada mostra 1,7 mL e 8 μ L. Os tubos introducíronse de novo ao incubador durante 2 horas a 150 rpm.

Tarefa 2. Extracción da porción bioaccesible e limpeza/preparación para análise. Para proceder á análise é preciso desalgar as mostras de péptidos dixeridos, que conteñen os fluidos biolóxicos simulados. Para tal fin, realizouse unha extracción en fase sólida con cartuchos C18. Previamente, as mostras foron centrifugadas a 100 rpm durante 1 minuto e retiróuselles o sobrenadante (porción bioaccesible do pan).

Para acondicionar o cartucho empregáronse 2 mL de metanol e de seguido 2 mL de H₂O. Fíxose pasar 2 mL do sobrenadante da mostra de péptidos dixeridos e realizouse un lavado con outros 2 mL de H₂O. Para a elución empregáronse 4 mL de metanol cun 1% de ácido fórmico.

Tarefa 3. Secuenciación dos péptidos liberados. A secuenciación dos péptidos das mostras de pan realizouse seguindo o procedemento descrito por Pérez-Gregorio et al. (2021). Resumidamente, as mostras obtidas na tarefa 2, foron inxectadas nun sistema nano-HPLC e detectadas nun detector de espectrometría de masas Orbitrap Q Exactive. A separación cromatográfica foi realizada nun nano-UHPLC Dionex TM 3000 LC acoplado a un Orbitrap Q Exactive con fonte nano spray (Thermo Scientific). O sistema foi controlado polos software

Chromleon (UHPLC) e Xcalibur (HR-MS/MS). Foi utilizada unha columna PepMap C18 (15 cm x 75 μ m) 2nm (Thermo Científico) no proceso de separación do LC. Unha mestura binaria de solventes foi utilizada para a análise cromatográfica; consistido en 0.2% (v/v) ácido fórmico (solvente A), e 0.2% (v/v) ácido fórmico en acetonitrilo (solvente B). O gradiente variou de 5 a 90 %B en 60min a 0.25 μ L/min. O volume de inxección foi axustado para conseguir unha concentración de proteína final de 2 μ g no sistema. Os parámetros de operación do espectrómetro de masas foron: temperatura capilar 250°C, voltaxe da fonte 1.9kV e lentes de tubo 100V.

O Tandem Masas (fragmentación MS/MS) foi levado a cabo inducendo a fragmentación dos top 15 picos máis intensos cunha exclusión dinámica de 30s. A resolución de masa foi fixada en 60000 e a enerxía de HCD utilizada foi de 35V.

Os espectros adquiridos foron procesados no Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific) para identificar peptidos e inferir a secuencia das proteínas. Para eso, utilizouse o proteoma do Triticum Aestivum (trigo) dispoñible na base de datos Uniprot. De seguido, os péptidos inmunolóxicos foron escollidos con base a estudos previos naqueles que conteñen os epítomos recollidos na Tabela 1.

Tabela 1. Epítomos relacionados coa doenza celiaca seleccionados no traballo

| Proteínas | Epítomos |
|--------------------------|--------------------|
| α -Gliadina | PYPQPQLPY |
| | PQPQLPYPQ |
| | PFQPQLPY |
| | FRPQQPYQ |
| α/β -Gliadina | QQPQQQFPQ |
| | PQPQQFPQ |
| | QPFQQQPF |
| | QQPIPQQPQ |
| γ -Gliadina | PQQSFPQQQ |
| | LQPQQPAQL |
| | QQPQQFPQ |
| | QQPQQPYQ |
| | SQPQQQFPQ |
| | QQPFQQPQ |
| | PQPQQQFPQ |
| | PYPQQPQQP |
| | QVPQQPQQP |
| | ω -Gliadina |
| PQPQQFPW | |
| IQPQQFPQ | |
| PQPQQQLPL | |
| Glutenina | PFSQQQSPV |
| | FSQQQQSPF |
| | QQPYPQQPY |
| | FSQQQQSPF |
| Avenina | PFQPQQPT |
| | PQPQQPTPI |

Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

Pérez-Gregorio, M. R., Bessa Pereira, C., Dias, R., Mateus, N., & de Freitas, V. (2021). New-Level Insights into the Effects of Grape Seed Polyphenols on the Intestinal Processing and Transport of a Celiac Disease Immunodominant Peptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(45), 13474–13486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03713>