



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGROALIMENTARI,  
AMBIENTALI E ANIMALI**

---

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Agrarie

Tesi di Laurea

**ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI ESOSOMI  
OTTENUTI DA COLTURE CELLULARI DI CAFFÈ**

Relatore:  
Prof. Marco Zancani

Laureando:  
Guido Morossi

Correlatore:  
Dott.ssa Dora Scarpin

---

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

## Riassunto

Gli esosomi sono vescicole di forma sferica, di dimensioni medie comprese tra i 30 e i 100 nm e vengono secrete dalla maggior parte delle cellule nello spazio extracellulare. Gli esosomi di origine vegetale, oltre a modulare molte funzioni biologiche come la comunicazione cellulare e a fornire indicazioni molto importanti riguardo le condizioni fisiopatologiche della cellula da cui hanno origine, giocano un ruolo attivo nella difesa della pianta dai patogeni. Diversi studi hanno dimostrato non solo gli effetti sulla salute umana del caffè e degli esosomi estratti da caffè ma, recentemente, è stato dimostrato che il cafestolo, un metabolita secondario presente in tutte le specie del genere *Coffea*, ha effetti antifungini e insetticidi significativi. Ad oggi, tuttavia, mancano ancora protocolli di estrazione standardizzati che permettano di ottenere l'isolamento di esosomi da colture cellulari in mezzo liquido in maniera ripetibile e costante.

In questo lavoro di tesi sono stati isolati e caratterizzati esosomi derivanti da colture cellulari di caffè in mezzo liquido utilizzando delle metodologie semplificate e facilmente ripetibili, come filtrazione e centrifugazioni differenziali. Sono state così ottenute delle vescicole di dimensioni 20 - 70 nm, che sono state poi caratterizzate per conoscerne l'origine.

La messa a punto di una metodologia affidabile e replicabile di isolamento di esosomi ottenuti da colture cellulari di caffè potrebbe avere una grande rilevanza in futuro poiché queste vescicole sono vettori naturali di metaboliti secondari e potrebbero essere utilizzati nella loro forma nativa come trattamento antifungino e insetticida biocompatibile e a degradabilità completa. Inoltre, l'attività naturale di queste vescicole potrebbe essere coadiuvata o regolata dall'effetto di sostanze bioattive caricate al loro interno, utilizzando gli esosomi come vettori.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 La struttura degli esosomi.....	1
1.2 Prospettiva storica.....	3
1.3 Caratteristiche e applicazioni degli esosomi derivati da animali.....	5
1.4 Esosomi di origine vegetale.....	6
1.5 Funzioni patologiche e fisiologiche negli organismi.....	8
1.6 Esosomi: studi e interessi.....	9
1.7 Applicazioni tecnologiche.....	10
1.8 Applicazioni agronomiche.....	14
1.9 Caffè: pianta e proprietà.....	16
1.10 Esosomi di caffè.....	17
1.11 Colture <i>in vivo</i> di cellule e tessuti vegetali per ottenere esosomi.....	19
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>23</b>
3.1 Materiale vegetale di partenza.....	23
3.2 Colture cellulari di caffè.....	23
3.2.1 Misurazione della crescita delle sospensioni cellulari.....	24
3.3 Tecniche di isolamento degli esosomi.....	27
3.3.1 Filtrazione.....	27
3.3.2 Centrifugazioni.....	28
3.4 Determinazione della quantità di proteina del campione.....	30
3.5 Determinazione delle dimensioni delle particelle e del potenziale Zeta.....	32
3.6 Elettroforesi.....	33
3.7 Western blot.....	36
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>40</b>
4.1 Curve di crescita della sospensione cellulare.....	40
4.2 Saggio di vitalità cellulare.....	42
4.3 Quantificazione proteica.....	44
4.4 Dimensioni delle particelle e potenziale Zeta.....	45
4.5 Separazione elettroforetica delle proteine.....	46
4.6 Immunodeterminazione di alcuni marcatori di membrana.....	47
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>49</b>



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 La struttura degli esosomi

Gli esosomi sono nanovesicole di forma sferica, delimitate da una membrana composta da un doppio strato fosfolipidico avente spessore medio di 5 nm. Le componenti lipidiche degli esosomi includono ceramide (utilizzata per distinguere gli esosomi dai lisosomi), colesterolo, sfingolipidi e fosfogliceridi. Inoltre, la superficie della membrana è ricca di catene saccaridiche come mannosio, polilattosammine, acido alfa-2,6 salicilico e N-glicani.

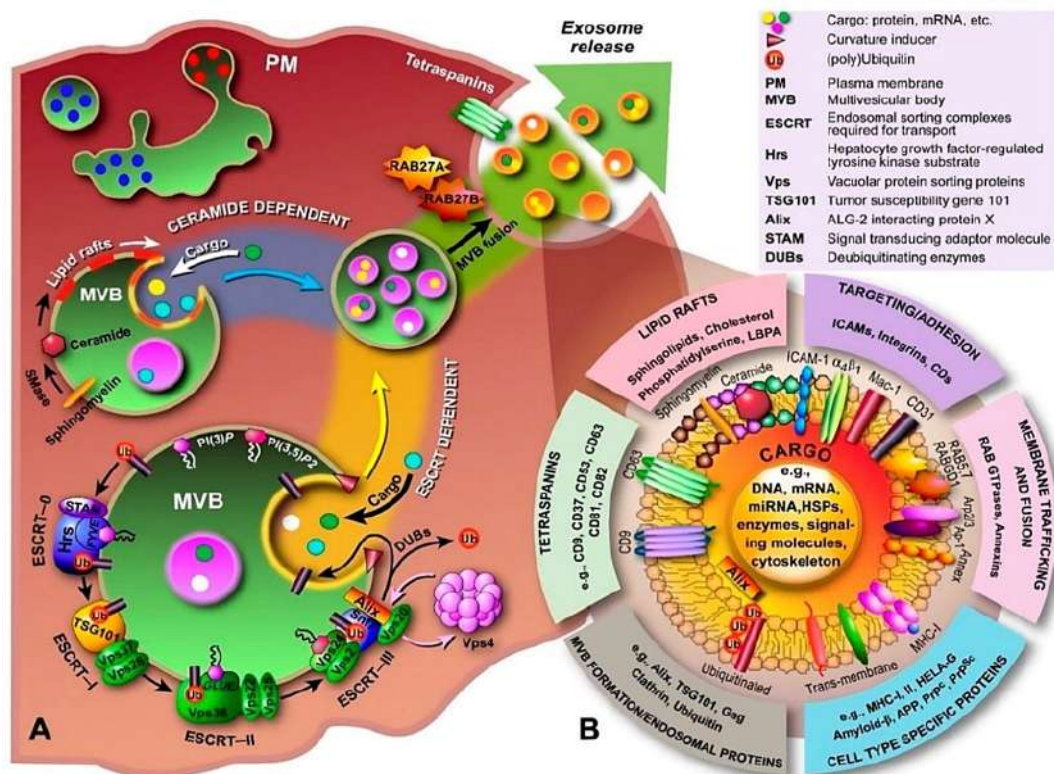
Di grande interesse sono le proteine presenti sia sulla superficie che all'interno degli esosomi. Queste sono il componente incapsulato più importante, in quanto contengono informazioni fondamentali sullo stato fisiologico delle cellule di origine. La maggior parte delle proteine trasportate sono comuni a tutti gli esosomi, tuttavia una piccola frazione è cellula-specifica, cioè in grado di riflettere il tipo e le condizioni fisiopatologiche delle cellule da cui derivano. Le proteine comuni a tutti gli esosomi comprendono il recettore del fattore di crescita (in grado di stimolare la differenziazione cellulare e prevenendo l'apoptosi), lattaderina (lactadherin), proteine transmembrana e lisosomi associati a proteine di membrana, annessine, GTPasi, heat shock proteins, tetraspanine e fosfolipasi. Tutte queste proteine vengono usate come biomarker per l'isolamento e la quantificazione di queste nanovesicole.

Altri componenti fondamentali trasportati dagli esosomi sono gli acidi nucleici che includono DNA, RNA codificante e non codificante come RNA messaggero (mRNA) e microRNA (miRNA). Questi permettono attraverso un'accurata quantificazione di riflettere molte patologie delle cellule da cui derivano.

Le cellule eucariotiche e procariotiche secernono principalmente tre classi di vescicole extracellulari (EVs): corpi apoptotici, microvescicole ed esosomi. I corpi apoptotici hanno un diametro tra i 1000 e i 5000 nm e derivano dalla frammentazione del nucleo e dal citoplasma di una cellula durante il processo di morte cellulare programmata. Le microvescicole hanno un diametro compreso tra i 100 e i 1000 nm e derivano dalla gemmazione del plasmalemma. Infine, gli esosomi hanno un diametro compreso tra i 30 e 100 nm e, diversamente dalle altre Evs, si formano all'interno della cellula seguendo la via endosomiale. Dapprima si formano endosomi precoci dall'invaginazione ed endocitosi della membrana plasmatica, che poi matureranno in endosomi tardivi. Dopo aver incapsulato composti bioattivi come mRNA, miRNA e proteine,

attraverso l'invaginazione di porzioni di membrana endosomiale si formano i corpi multivescicolari (MVBs). I corpi multivescicolari vanno incontro a due percorsi, possono essere degradati fondendosi con un lisosoma oppure possono fondersi con il plasmalemma e rilasciare le vescicole al loro interno nella matrice extracellulare sotto forma di esosomi (Fig. 1). Questi possono essere assorbiti da cellule vicine e lontane attraverso endocitosi, fagocitosi e fusione del plasmalemma, risultando in un'alterazione dello stato fisiologico delle cellule riceventi (Li et al., 2017).

In passato si credeva che gli esosomi avessero la funzione di smaltimento delle sostanze di scarto, ma studi recenti hanno dimostrato che hanno un importante ruolo nella comunicazione tra cellule (De Palma et al., 2020). La comunicazione cellulare è fondamentale negli organismi multicellulari e si pensava fosse possibile solo attraverso la via contatto dipendente (contatto diretto tra cellule adiacenti), paracrina (legami tra molecole segnale e recettori di cellule vicine), endocrina (legame tra ormoni e cellule distanti attraverso il sistema circolatorio) e nervosa. Studi recenti hanno evidenziato la possibilità di una forma di comunicazione cellulare mediata dagli esosomi e implicata in diversi processi, tra cui difesa immunitaria, angiogenesi, senescenza, proliferazione, differenziazione e in diverse malattie umane come malattie neurodegenerative, cancro e AIDS.



**Fig. 1:** Esosomi: Biogenesi (A) e composizione molecolare (B) (Kalra et al., 2015)

## 1.2 Prospettiva storica

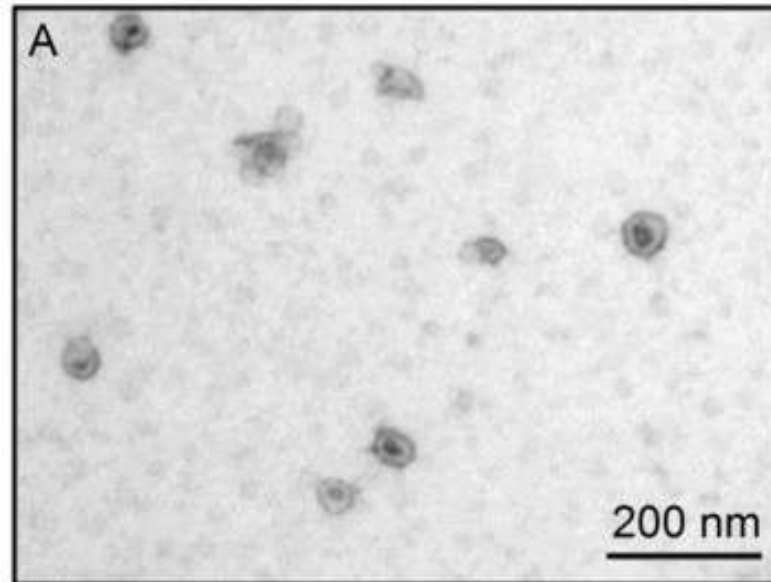
I primi studi sugli esosomi vegetali risalgono al 1967, quando Halperin e Jensen li osservarono attraverso un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) utilizzando colture cellulari di carota come materiale di partenza (Fig. 2) (Huang et al., 2021).

Anche batteri Gram-positivi e Gram-negativi rilasciano nano vescicole nell'ambiente extracellulare. I primi studi su batteri Gram-negativi risalgono agli anni '60 e, grazie alla microscopia elettronica, si scoprì che sono in grado di rilasciare nano vescicole circolari, di dimensioni che variano dai 20 ai 200 nm formate da un doppio strato lipidico contenenti proteine bioattive, lipidi, acidi nucleici e diversi fattori di virulenza. La presenza di queste nanovesicole, assimilabili agli esosomi animali e vegetali, negli ultimi 15 anni è stata dimostrata *in vitro*; nell'ambiente, ad esempio nelle acque di scarico, nelle fognature, nella polvere e nel suolo; e nei tessuti e fluidi biologici, ad esempio nel fluido cerebrospinale e nel sangue dei pazienti durante infezioni batteriche acute e nello stomaco di pazienti infettati da *Helicobacter pylori*. Questi studi possono essere molto utili per la formulazione di vaccini contro batteri patogenici sia di tipo Gram-negativo che di tipo Gram-positivo, anche se per questi ultimi si devono effettuare delle ricerche più approfondite (Kim et al., 2015).

La scoperta degli esosomi animali risale al 1983, in due studi indipendenti di Harding et al. e Pan et al. In questi studi sono state coltivati globuli rossi giovani (reticolociti) con i recettori della transferrina marcati per tracciare il movimento di questi recettori dalla membrana plasmatica ai reticolociti. È stato osservato che questi recettori marcati vengono assorbiti dai reticolociti e "impacchettati" in piccole vescicole al loro interno. Solo successivamente, nel 1989, Johnstone et al. chiamarono per la prima volta queste vescicole: "Esosomi" (You et al., 2021).

È molto più recente invece la scoperta dell'esistenza degli esosomi rilasciati da funghi. I primi studi su questi esosomi sono stati effettuati alla fine degli anni '2000 e fino ad ora sono state descritte diverse specie in grado di rilasciarli come *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pichia fermentans*, *Candida albicans* e *Sporothrix brasiliensis*. Da un punto di vista funzionale gli esosomi batterici sono coinvolti nella comunicazione cellulare e nella virulenza fungina. Per quanto riguarda *Cryptococcus neoformans*, fungo molto pericoloso per individui immunodepressi e causa di criptococcosi, gli esosomi rilasciati da questo fungo contengono molti fattori di virulenza come GXM, glucosilceramide, ureasi, laccasi, fosfatasi acida e molte proteine antiossidanti (Schuh et al., 2019).

Kazuo Ikeda et al., hanno dimostrato che le vescicole extracellulari di *Sporothrix brasiliensis* portano ad una sovraespressione dei geni IL-12p40 e TNF- $\alpha$  da parte di cellule dendritiche in vitro e un aumento di virulenza in lesioni della pelle nei topi.



**Fig. 2:** Esosomi derivanti dal plasma al microscopio elettronico (Lobb et al., 2015)



### 1.3 Caratteristiche e applicazioni degli esosomi derivanti da animali

Sebbene gli esosomi vegetali siano stati osservati prima di quelli animali, e recenti studi abbiano dimostrato il loro potenziale terapeutico, la maggior parte delle ricerche si sono concentrate su esosomi derivanti da colture cellulari di mammiferi. Gli esosomi animali vengono isolati solitamente da terreno di coltura e fluidi biologici come sangue, saliva, sperma, urine, latte, liquido cefalorachidiano, liquido sinoviale, liquido broncoalveolare, liquido amniotico e feci; e solo in qualche caso è stata descritta la produzione di queste vescicole in organismi standard presi come modello, come *Caenorhabditis elegans* (Liégeois et al., 2006) e *Drosophila melanogaster* (Beckett et al., 2013; Corrigan et al., 2014).

Le applicazioni di questi esosomi possono essere diverse, dipendentemente dalla specie, dal tessuto e dal tipo di cellula da cui questi vengono originati. Tra le applicazioni più importanti ci sono sicuramente quelle mediche. Già negli anni '70 sono state ottenute delle microvescicole da cellule cancerogene di pazienti affetti da linfoma di Hodgkin. Questo ha fatto comprendere le potenzialità diagnostiche degli esosomi, poiché i livelli di esosomi presenti nelle urine, nel siero e nelle feci dei pazienti malati di cancro era più alto rispetto ad individui sani. Inoltre, studi recenti hanno riportato che negli esosomi di persone affette da cancro ci fosse una composizione di RNA e miRNA differente rispetto al gruppo di controllo.

Inoltre, è stato ipotizzato che gli esosomi derivati da cellule tumorali maligne potrebbero avere un ruolo antitumorale poiché il profilo proteico e di RNA di queste vescicole manifesta le condizioni della cellula da cui hanno origine. Lo sfruttamento di questi profili di RNA può essere utilizzato come un biomarker aggiuntivo ed aiutare a distinguere le cellule benigne dalle maligne. Per di più la capacità degli esosomi di trasportare RNA tra le cellule suggerisce che potrebbero essere utilizzati da un punto di vista terapeutico per somministrare medicinali basati su specifici acidi nucleici. Inoltre, esosomi derivanti da cellule tumorali potrebbero contenere degli anticorpi tumore-specifici, fondamentali per la produzione di vaccini contro il cancro basato su esosomi derivati da cellule tumorali (Rutter et al., 2017)

Tra le altre possibili applicazioni degli esosomi è stato dimostrato come siano in grado di fungere da trasportatori per molecole bioattive con un'alta affinità per i siti target, possono essere utilizzati per il trattamento di infiammazioni cerebrali caricando gli esosomi con sostanze farmacologicamente attive, il trattamento dell'artrite, l'immunoterapia, la cura di malattie al sistema nervoso e la modulazione della senescenza cellulare.

L'applicazione clinica delle EVs sull'uomo, tuttavia, richiede grandi quantità di queste vescicole che, se derivanti da colture cellulari animali, richiederebbero alti costi e molto tempo per

la produzione. Inoltre, la coltura cellulare di esosomi derivati da mammiferi richiede componenti derivanti da animali, come il siero fetale bovino (*fetal bovine serum*, FBS), generalmente vietati per la produzione di medicinali per ragioni di sicurezza. Per queste ragioni, recentemente è stato proposto l'utilizzo di fonti di EVs alternative per superare i limiti di produzione sia qualitativi che quantitativi.

#### **1.4 Esosomi di origine vegetale**

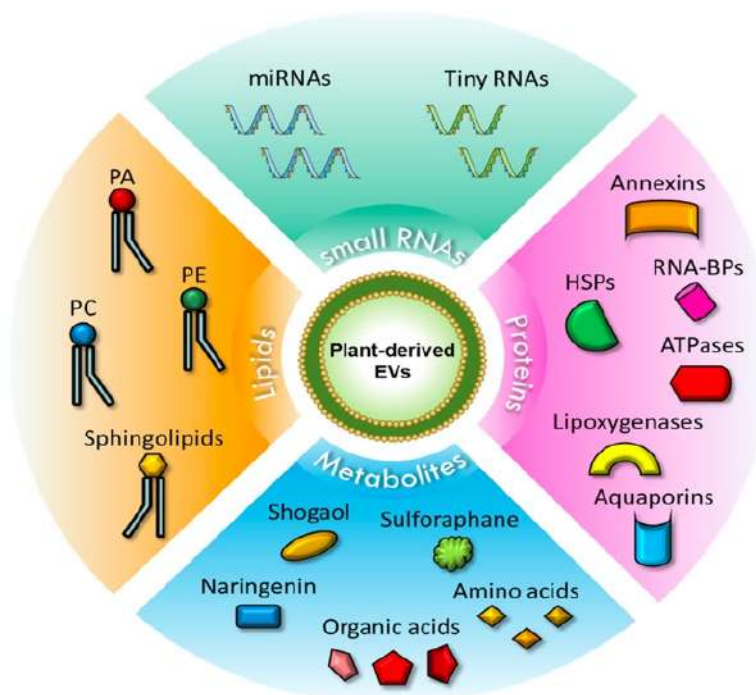
Gli esosomi vegetali hanno una struttura simile a quelli animali e si presentano come ottimi candidati date le loro proprietà terapeutiche intrinseche e la possibilità di avere una grande quantità di materiale per l'isolamento (Fig. 3).

Esosomi derivanti da uva, assunti per via orale, migrano fino alle cellule staminali intestinali e sono in grado di avere un ruolo di protezione nei confronti delle coliti nei topi. Dopo essere stati assorbiti all'interno delle cellule target, queste vescicole innescano una grande quantità segnalazioni intracellulari a cascata, modulando la risposta cellulare e ristabilendo l'omeostasi nei tessuti. Esosomi derivanti da zenzero assunti per via orale, vengono assorbiti dalle cellule epiteliali intestinali e dai macrofagi riuscendo ad alleviare coliti acute, a prevenire coliti croniche e tumore del colon. Esosomi di mirtillo sono in grado di modulare l'espressione dei geni che regolano la risposta infiammatoria, il rilascio di citochine e lo stress ossidativo. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che gli esosomi derivanti da fragola trasportano vitamina C, prevenendo lo stress ossidativo in cellule umane. Esosomi derivanti da limone hanno un'attività antineoplastica in vitro su diversi gruppi di cellule tumorali. Infine, esosomi derivanti da cavolo promuovono la proliferazione delle cellule di mammiferi e riducono drasticamente le infiammazioni e l'apoptosi di cheratinociti e fibroblasti nell'uomo.

L'utilizzo degli esosomi vegetali come nanovettori di molecole farmacologicamente attive ha diversi vantaggi rispetto all'uso degli stessi derivati da animali. Innanzitutto, la selezione dei nanovettori derivati da esosomi animali ha criteri severissimi, in quanto le intrinseche azioni biologiche e il tipo di cellula di provenienza possono avere un effetto indesiderato sull'ospite. Ad esempio, vescicole derivate da cellule tumorali animali possono trasmettere caratteri cancerogeni alle cellule dell'ospite. I nanovettori derivati da esosomi vegetali, se messi a confronto con quelli derivati da animali, sono del tutto inermi, hanno basso effetto immunogenico, un miglior assorbimento cellulare, maggiore stabilità nel tratto gastrointestinale e miglior specificità ai target.

Inoltre, la preparazione dei nanovettori derivati da esosomi vegetali può essere eseguita con metodologie meno complesse di quelle utilizzate per gli stessi derivati da animali, che richiedono ad esempio il processo di estrusione e microemulsificazione, metodologie usate solitamente per la produzione di liposomi. Se confrontiamo queste vescicole proprio con i liposomi, la capacità di raggiungere cellule tumorali delle prime è 10 volte maggiore delle seconde. A differenza di nanovettori derivati da esosomi animali o da batteri, gli esosomi vegetali hanno dimostrato un abbattimento dei rischi potenziali di trasferimento indesiderato di proteine e materiale genetico. Inoltre, diversamente dai liposomi sintetizzati artificialmente, è stato dimostrato che hanno una migliore capacità di attraversare le barriere biologiche più difficili, come la barriera emato-encefalica, riducendo le infiammazioni e le necrosi. Infine, il doppio strato lipidico della membrana non solo può essere modificato per aumentare la specificità del bersaglio, ma è anche in grado di proteggere il contenuto trasportato dalla decomposizione provocata da proteinasi e nucleasi.

Tuttavia, gli esosomi vegetali non sono ancora stati studiati a sufficienza, nonostante le loro potenzialità, infatti solo pochi studi hanno ricercato l'effetto di queste vescicole sull'uomo. Per di più, non esiste un metodo standard di isolamento di queste vescicole nelle piante che ne assicuri purezza e un'alta resa.



**Fig. 3:** Rappresentazione schematica della composizione di esosomi di origine vegetale (Urzi et al., 2021)

## 1.5 Funzioni fisiologiche e patologiche negli organismi

Gli esosomi vegetali sono coinvolti nella comunicazione cellulare tra piante e patogeni. Questo tipo di comunicazione richiede la secrezione e il trasporto di segnali molecolari nell'ambiente extracellulare e successivamente negli organismi bersaglio, un processo fondamentale sia per la difesa della pianta che per la virulenza del patogeno.

Studi su pomodoro hanno identificato 179 proteine coinvolte nelle interazioni pianta-patogeno. In particolare, è stato osservato che l'applicazione di esosomi derivanti da radici di pomodoro porta ad una significativa inibizione della germinazione delle spore e dello sviluppo del tubetto germinativo di *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*. La composizione proteica di queste vescicole suggerisce la loro importanza nella difesa della pianta, indicando queste vescicole come nuovi interessanti componenti del sistema immunitario delle piante (De Palma et al., 2020).

Altri studi hanno dimostrato che diversi tipi di RNA, tra cui i *regulatory small RNAs* (sRNAs), vengono trasportati dalla pianta al patogeno e sono in grado di regolare i processi biologici nelle cellule destinarie. In passato, la secrezione di RNA e il suo trasporto nelle cellule dei patogeni era per lo più sconosciuto. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che proprio le EVs sono in grado di mediare il trasporto di sRNAs dalle piante ai patogeni.

Inoltre, gli esosomi vegetali sono stati sfruttati nella loro forma nativa sull'uomo date le loro proprietà antinfiammatorie, antitumorali e di rigenerazione dei tessuti. Tra le proprietà terapeutiche intrinseche degli esosomi vegetali è stato riscontrato il mantenimento delle cellule staminali intestinali che migliora le difese verso le coliti e ha effetti positivi sulle infiammazioni intestinali. In più, sono in grado di prevenire malattie epatiche legate al consumo di alcool, favoriscono la guarigione delle ferite e vengono utilizzate nell'immunomodulazione oncologica. Per di più, possono essere sfruttati come nanovettori per il trasporto di molecole bioattive (Huang et al., 2021).

## 1.6 Esosomi: Studi e interessi

Nel corso degli anni, alcuni studi hanno osservato al TEM gli esosomi vegetali nelle zone di interazione pianta-fungo, ad esempio, in cellule epidermiche di foglie d'orzo infettate da *Blumeria graminis f. sp. hordei* (An et al., 2006), in cellule fogliari di *Arabidopsis* infettate da *Botrytis cinerea* (Cai et al., 2018) e in micorrize arbuscolari (modificazioni ifali di tipo micorrizico) di *Rhizophagus irregularis* in riso (Roth et al., 2019). Sia il microscopio elettronico a trasmissione che il microscopio confocale hanno permesso l'identificazione corpi multivescicolari (MVBs) vegetali fusi alla membrana plasmatica nei siti di invasione fungina, suggerendo che il rilascio degli esosomi sia mediato dai MVBs. Questi dati suggeriscono che la secrezione degli esosomi nelle piante contribuisca alla formazione delle prime strutture di difesa verso i patogeni (Huang et al., 2021).

Gli studi di Nowara et al. indicano che gli esosomi vegetali potrebbero mediare il trasporto di piccoli RNA interferenti dalle cellule della pianta alle cellule del fungo inducendo il silenziamento genico. Durante questo processo, piccoli RNA espressi nella pianta sono in grado di indurre un silenziamento di sequenze target specifiche nelle cellule del fungo e soprattutto negli austori (Nowara et al., 2010). Altri studi al TEM hanno mostrato che nello spazio extra-austoriale sono presenti molte vescicole, di origine sia vegetale che fungina. È stato infatti osservato che i microRNA fungini sono in grado di attaccare geni target nelle cellule vegetali ospiti, indicando l'esistenza di un meccanismo di secrezione di RNA da parte del fungo e di acquisizione da parte della cellula ospite. Questo fenomeno è stato osservato anche nelle piante parassite, in quanto formano austori con i quali trasportano mRNA all'interno dei tessuti dell'ospite. Questi mRNA possono influire su cellule anche molto lontane dall'austorio, suggerendo il loro possibile trasporto all'interno degli esosomi.

## 1.7 Applicazioni tecnologiche

Dal punto di vista dello sfruttamento tecnologico, gli esosomi vegetali, come gli esosomi animali, hanno delle proprietà uniche. Infatti, ciò che trasportano può fornire informazioni utilissime sulle cellule da cui derivano. Ad esempio, il contenuto di RNA degli esosomi varia moltissimo e dipende dal tipo e dallo stato fisiologico e patologico della cellula sorgente.

Gli esosomi vegetali, contenendo naturalmente composti bioattivi come lipidi, proteine, RNA e altre molecole farmacologicamente attive, offrono delle caratteristiche morfologiche e biochimiche che li rendono degli ottimi nanotrasportatori che potrebbero rispondere alle richieste cliniche per il trasporto di bioterapici e farmaci di nuova generazione con un'alta efficienza. Inoltre, questo studio mette in evidenza la possibilità di reingegnerizzare queste nanovesicole per creare dei nanovettori più resistenti, innocui e non immunogeni, in grado di attraversare le barriere biologiche più complesse per trasportare sostanze attive in organi come il cervello e l'intestino. Date queste caratteristiche, gli esosomi vegetali rappresentano dei trasportatori adatti per la nanomedicina, anche perché sono relativamente semplici da ottenere. Al contrario, nanoparticelle sintetiche presentano diverse problematiche come immunogenicità, citotossicità e complessità di produzione. In più, gli esosomi vegetali, data la loro origine naturale e la loro composizione, non vengono rilevati dal sistema immunitario risultando in un maggior tempo di circolazione nell'organismo e quindi una maggiore biodisponibilità. Diversamente dai mammiferi, l'utilizzo di materiale derivante da vegetali riduce il trasporto di patogeni e di agenti zoonotici, inoltre è stato dimostrato presentano una migliore capacità di assorbimento nel sito target, un alto rendimento nel trasporto di agenti terapeutici e costi di produzione relativamente bassi.

Ci sono due tipi di nanopiatteforme che possono essere utilizzate per scopi terapeutici e per il trasporto di farmaci, gli esosomi vegetali nella loro forma originaria e i nanovettori derivati da esosomi vegetali. Le problematiche di maggiore importanza per l'utilizzo degli esosomi vegetali come nanotrasportatori consistono nell'ottenimento di vescicole di dimensioni uniformi, dato che le dimensioni possono variare molto, e nel caricamento efficiente delle sostanze attive. Per superare queste problematiche è stata utilizzata la tecnica *Bligh and Dyer* (un metodo di estrazione liquido-liquido) per estrarre i nanolipidi dagli esosomi e reingegnerizzarli in nanovettori derivati da esosomi utilizzando un estrusore per lisosomi da 200 nm.

I nanovettori derivati da esosomi vegetali, inoltre, offrono la possibilità di adattare la loro superficie, aumentando la specificità ed espandendo il ventaglio dei target possibili. Al riguardo, specifiche molecole bioattive possono essere aggiunte sulla superficie di queste nanovesicole per renderle maggiormente compatibili ai recettori delle cellule bersaglio. Ad esempio, modificando

queste vescicole per avere una maggiore specificità verso cellule tumorali, si assiste ad un'intensificazione delle proprietà antitumorali intrinseche. Questa tecnica è stata usata in nanovettori derivati da esosomi di zenzero, modificando la loro superficie con acido folico e *arrowtail* pRNA-3WJ per l'identificazione degli esosomi nell'organismo e per il trasporto dei geni al sito tumorale.

Ulteriori studi riportano che è possibile marcare i nanovettori derivati da esosomi di uva con carbocianina lipofilica (DiR), un tracciante che permette il loro rilevamento *in vivo*. Inoltre, la possibilità di modificare la superficie di queste vescicole aumenta anche la capacità di trasporto degli acidi nucleici. Per esempio, l'utilizzo di polietilenimina su nanovettori derivati da esosomi di uva non solo ha migliorato il trasporto di geni verso i tumori cerebrali ma ha anche diminuito la citotossicità intrinseca della polietilenimina. Analogamente, la fusione di peptidi nel doppio strato lipidico di queste vescicole ha migliorato l'assorbimento cellulare e la penetrazione dei tessuti. Oltretutto, per massimizzare gli scopi terapeutici di questi nanovettori, alla loro superficie possono essere associate anche molecole "medicinali".

Negli ultimi anni, l'accrescimento dell'interesse verso gli esosomi vegetali ha fatto emergere le potenzialità terapeutiche di queste vescicole. Attraverso l'aumento degli studi sui miRNA è stato compreso quanto siano strettamente connessi alla proliferazione tumorale e alla morte cellulare. Inoltre, molte ricerche hanno dimostrato che i miRNA derivati da vegetali sono in grado di fare un salto di specie ed avere un ruolo regolatorio anche nell'organismo umano.

Per quanto riguarda la loro attività antitumorale, nanovettori derivati da esosomi di zenzero hanno dimostrato risultati promettenti nella limitazione della carcinogenesi colon-rettale diminuendo la produzione di citochine infiammatorie e inibendo la proliferazione e l'apoptosi delle cellule epiteliali intestinali. È stato osservato che nanovettori derivati da esosomi di limone sono in grado di inibire lo sviluppo dei tumori in casi di leucemia mieloide cronica (CML) *in vivo*.

Le presenti metodologie chemioterapeutiche utilizzate nelle cure contro i tumori presentano due grandi ostacoli: la bassa specificità alle cellule target e l'alta tossicità. I nanovettori derivati da esosomi vegetali hanno dimostrato di essere inermi, non immunogenici e con un'alta specificità alle cellule target. In particolare, studi su nanovettori derivati da esosomi di zenzero reingegnerizzati hanno dimostrato il trasporto di doxorubicina in cellule tumorali provenienti da colon, inibendone la crescita. Questo effetto non è solo merito della doxorubicina ma anche delle proprietà intrinseche degli esosomi di zenzero, come la diminuzione dello stress ossidativo e del livello di citochinine pro-infiammatorie. In altri studi, nanovettori derivati da esosomi di uva sono stati utilizzati per trasportare acido folico e paclitaxolo in cellule tumorali del colon. In questo studio si è dimostrata la loro specificità alle cellule target e il basso rischio di utilizzo. Un altro

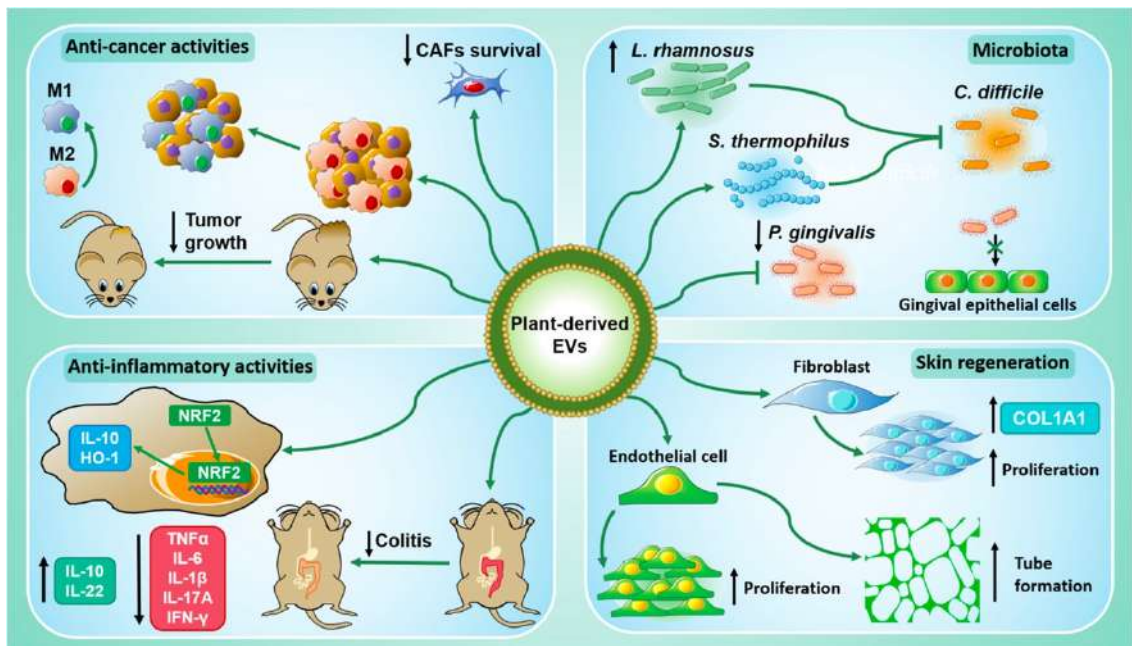
studio su topi gravidi ha dimostrato che per iniezione intravenosa questi nanovettori non oltrepassano la barriera placentare, dimostrando il potenziale per un futuro utilizzo di nanovettori derivati da esosomi di uva nel trasporto di farmaci nelle donne in gravidanza.

Queste vescicole hanno anche un importante effetto rigenerativo. Gli studi di Ju et al. hanno dimostrato che gli esosomi derivati da uva sono in grado di diffondersi ed essere assorbiti dalle cellule staminali intestinali, di indurre la proliferazione delle cellule staminali intestinali *Lgr5<sup>hi</sup>* e di rigenerare il tessuto epiteliale intestinale. Questi studi hanno mostrato gli effetti positivi di queste vescicole verso le coliti e il possibile utilizzo di questi esosomi per indurre la proliferazione di cellule staminali anche per altre patologie in futuro. Anche esosomi derivati da zenzero permettono di migliorare la guarigione da lesioni intestinali inibendo l'espressione di emopessina, una proteina plasmatica che ha la funzione di legare l'eme derivato dalla distruzione dei globuli rossi, e promuovendo l'espressione di proteine citoplasmatiche e mitocondriali come *heat shock proteins*, axina e chinesine. Inoltre, il già menzionato effetto epatoprotettivo di queste vescicole per migliorare i danni al fegato provocati da alcool. Altri studi hanno dimostrato *in vitro* la capacità degli esosomi derivati da frumento di promuovere la rigenerazione della cute attivando azioni proliferative e migratorie di fibroblasti epiteliali, endoteliali e dermali in maniera dose-dipendente. Inoltre, è stato riscontrato un aumento significativo dell'espressione di mRNA di collagene di tipo I. Oltre agli effetti proliferativi e migratori, è stato dimostrato che queste vescicole hanno un effetto angiogenico, sarebbero quindi capaci di indurre la neoformazione vascolare durante il processo di guarigione delle lesioni.

Recenti studi hanno dimostrato un altro importante utilizzo di questi nanovettori: la loro efficacia nel trasporto di sostanze bioattive per via transcutanea. Nanovettori derivati da broccoli, data la loro natura altamente lipofila, presentano un'alta efficienza di intrappolamento e riescono a penetrare fino agli strati più bassi della cute. Date queste caratteristiche, questi esosomi potrebbero essere impiegati nel trasporto genico transcutaneo per la cura di melanomi cutanei (Dad et al., 2021).

Altri studi hanno dimostrato il potenziale applicativo di queste vescicole per la diagnosi, il trasporto di sostanze bioattive e il trattamento della sclerosi laterale amiotrofica (SLA). L'ipotesi di utilizzo deriva dalla capacità degli esosomi di modulare la segnalazione paracrina e dal loro effetto neuroprotettivo. In particolare, avendo dimostrato il loro ruolo nella rigenerazione nervosa, nella protezione delle cellule nervose, nella plasticità sinaptica e nella rimielinizzazione, gli esosomi si candidano come nuova opzione terapeutica per la cura di malattie neurodegenerative come ischemia cerebrale, Alzheimer, Parkinson, SLA, sclerosi multipla e tumori cerebrali (Fig. 4) (Karamanidou et al., 2022).





**Fig. 4:** Principali proprietà e funzioni biologiche degli esosomi vegetali (Urzi et al., 2021)

## 1.8 Applicazioni agronomiche

Le richieste sempre maggiori di cibo salutare e con un'alta qualità nutrizionale, e di prodotti fitosanitari e fertilizzanti con basso o nullo impatto sull'ambiente e sulla salute, ha fatto emergere i limiti delle tecniche convenzionali adottate in agricoltura, che utilizzano dosi massicce di fertilizzanti e prodotti fitosanitari con effetti negativi sugli organismi e sull'ecosistema.

Per evitare di compromettere gli equilibri biologici che regolano un determinato agrosistema si utilizzano tecniche di agricoltura sostenibile che prevedono l'utilizzo minimo di trattamenti e bassi input nel sistema produttivo per garantire la tutela dell'ambiente, la conservazione delle specie presenti e quindi della biodiversità, per abbassare i costi di produzione e aumentare il guadagno netto.

L'applicazione delle agro-nanobiotecnologie in agricoltura può aumentare in maniera significativa l'efficienza degli input immessi nel processo produttivo e offre un metodo di sviluppo sostenibile degli agrosistemi. Le nanoparticelle hanno molte qualità, tra cui dimensioni compatte, facilità di trasporto e di manipolazione, conservazione per lunghi periodi, alta efficienza e bassa tossicità che rendono queste tecnologie un innovativo alleato alle tecniche utilizzate in agricoltura convenzionale. A questo proposito sono stati sviluppati nanoregolatori della crescita per le piante, nanoprodotti fitosanitari, nanofertilizzanti, nanoerbicidi e nanosistemi di trasporto per sostanze bioattive. Queste tecnologie potrebbero determinare diversi vantaggi come l'aumento delle rese delle colture, l'inibizione dell'attività dei patogeni, il controllo sostenibile di piante infestanti e di insetti dannosi per le colture (Singh et al., 2021).

L'applicazione di nanomateriali su piante di specie differenti ha dimostrato effetti diversi in termini di cambiamenti morfologici e fisiologici, assorbimento e traslocazione. In molte colture è stata dimostrata una relazione dose-dipendente della risposta della pianta con variabilità tra le diverse specie. Inoltre, sfruttando le caratteristiche di queste nanoparticelle è possibile produrre delle formulazioni differenti per ogni specie in base alle esigenze delle colture agendo sulla forma, la carica elettrica, la composizione biochimica della membrana esterna e sull'agglomerazione. Inoltre, vengono utilizzati materiali diversi per la loro produzione come argento, titanio, zeolite, rame, silicio, alluminio, carbonio, zinco e azoto. In ambito agronomico le applicazioni di queste tecnologie includono anche la desalinizzazione e la rimozione di metalli pesanti dalle acque reflue, la riduzione dell'erosione del suolo e la possibilità di poter monitorare con precisione l'assunzione e la traslocazione dei nutrienti nelle piante (Reyes et al., 2018).

Diversi studi hanno dimostrato come l'efficienza delle pratiche di irrigazione sia ancora troppo bassa, mentre la qualità e la disponibilità dell'acqua nel pianeta è sempre minore. Questo,

oltre a determinare uno spreco di acqua si traduce in una diminuzione delle rese colturali. A questo proposito, ci sono evidenze bibliografiche che espongono come l'applicazione delle agro-nanobiotecnologie, attraverso l'unione delle discipline agronomiche, nanotecnologiche e biotecnologiche, permetta di migliorare la qualità delle acque e l'efficienza di irrigazione anche da un punto di vista tecnologico sviluppando dei filtri contenenti nanomateriali naturali o artificiali per migliorare l'efficienza dell'irrigazione e della subirrigazione (Ramirez et al., 2018).

Un'altra applicazione innovativa dei nanomateriali in agricoltura consiste nel trasporto e nella protezione di RNA specifici contro i patogeni. La tecnologia innovativa del silenziamento genico indotto da spray (SIGS), per esempio, permette di applicare superficialmente gli RNA sul materiale vegetale per il controllo dei patogeni. Tuttavia, l'applicazione dei SIGS è limitata dalla rapida degradazione dell'RNA se esposto alle condizioni atmosferiche esterne. Come già descritto, in natura la comunicazione interspecifica è mediata da RNA incapsulati in nanovesicole che proteggono e trasportano il contenuto in maniera sicura e specifica rispetto al target. Si è ipotizzato quindi l'utilizzo di nanovesicole prodotte artificialmente per il caricamento di RNA contro il fungo *Botrytis cinerea*. Le vescicole vengono prodotte con tre formulazioni lipidiche diverse e, tutte e tre, hanno consentito il trasporto di dsRNA (*double stranded RNA*) e l'assorbimento da parte del patogeno. Queste nanovesicole hanno protetto con successo il contenuto di dsRNA dalla degradazione da parte delle nucleasi per un lungo tempo poiché hanno una buona resistenza al dilavamento dalla superficie fogliare. In particolare, l'utilizzo di nanovesicole contenenti dsRNA ha prolungato la protezione verso *B. cinerea* di 10 giorni nei frutti di pomodoro e nell'uva, e di 21 giorni nelle foglie di vite.

Tuttavia, la mancanza di evidenze sperimentali sull'innocuità dei nanomateriali per le piante e per l'uomo ha suscitato dei timori riguardo l'utilizzo di queste tecnologie in pieno campo per il tipo di applicazione che potrebbero avere, la loro potenziale tossicità, l'assorbimento da parte delle cellule della coltura e i metodi di produzione. Diversi studi sull'applicazione di queste tecnologie su piante hanno riportato sia effetti positivi che negativi riguardo la crescita e lo sviluppo delle stesse. Questi effetti dipendono dalla natura del nanomateriale, dall'applicazione, dal tempo di esposizione, dalla specie e dalle caratteristiche del suolo.

Per un'effettiva applicazione delle nanotecnologie in agricoltura sono quindi richiesti studi maggiormente approfonditi per una maggiore comprensione di questi materiali, la valutazione degli effetti della loro applicazione e della loro ecotossicità.

Come già descritto sopra, gli esosomi vegetali sono nanovesicole in grado di essere caricate con diverse sostanze, tra cui RNA e dsRNA, metaboliti secondari e nanomolecole bioattive, sono target specifici, sono innocui, più economici delle nanovesicole prodotte

sinteticamente e potenzialmente producibili su larga scala. Inoltre, queste vescicole hanno già dimostrato di essere in grado di regolare la crescita del tubetto germinativo di diversi funghi patogeni come *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*. Queste caratteristiche e i recenti studi sull'applicazione di nanovesicole caricate con RNA e dsRNA contro i danni di *B. cinerea* identificano gli esosomi vegetali come candidati ideali per l'applicazione delle tecniche agro-nanobiotecnologiche (Qiao et al., 2023).

## 1.9 Caffè: pianta e proprietà

Il caffè è la terza bevanda al mondo per consumo dopo l'acqua e il tè e si colloca per valore economico al settimo posto delle *commodities* agricole commerciate legalmente. Viene coltivato nelle aree tropicali e sub-tropicali del Centro e Sud-America, dell'Asia sud-orientale e dell'Africa. Esistono più di 100 specie di caffè ma solo due sono state addomesticate per la coltivazione: *Coffea arabica*, da cui si ottiene il tipo Arabica, e *Coffea canephora*, da cui si ottiene il tipo Robusta. La pianta del caffè è un arbusto che può arrivare fino a 5 metri di altezza. Il frutto è una bacca anche chiamata "ciliegia", ovale, verde, che a maturazione vira verso il giallo, poi verso il rosso e infine si presenta con una colorazione brunastra. Ogni ciliegia contiene generalmente due semi.

Il caffè, recentemente, ha guadagnato ancor più rilevanza grazie a diversi studi che hanno dimostrato i benefici sulla salute provocati dal consumo di questa pianta. Il consumo di caffè ha una correlazione negativa associata alla mortalità totale o causa-specifica.

Meta-analisi hanno dimostrato l'effetto protettivo e benefico del caffè verso disturbi cronici del fegato come la cirrosi e la fibrosi epatica e alla sopravvivenza a lungo termine dopo un trapianto di fegato. Gli effetti benefici del caffè sono stati dimostrati anche nel cervello. La malattia di Alzheimer è uno dei disordini neurogenerativi più comuni, e la sua diffusione mondiale sta aumentando nelle fasce di età più vecchie. I risultati di meta-analisi hanno dimostrato che un consumo regolare di caffè può aiutare a ridurre il rischio di sviluppare diversi disturbi neurodegenerativi come la malattia di Alzheimer, demenza e morbo di Parkinson.

Ad oggi, studi sulle componenti prodotte dal metabolismo secondario del caffè, come ad esempio caffeina, caffeolo, kahweol e trigonellina, non hanno ancora delucidato i meccanismi responsabili degli effetti benefici provocati dal consumo di caffè.

Il caffè contiene molti metaboliti secondari come l'acido idrossicinnamico, flavonoidi, tocoferoli, alcoli diterpenici, melanoidine e acidi clorogenici. Tra tutte le componenti presenti però, quella che ha ricevuto più interesse è stata la caffeina, tanto che gli effetti benefici del caffè

verso malattie neurodegenerative sono stati attribuiti alla sua quantità. Tuttavia, alcuni recenti studi hanno dimostrato che questi effetti si ottengono anche utilizzando caffè decaffeinato (Kantarcioglu et al., 2022).

## **1.10 Esosomi di caffè**

Nello studio di Kantarcioglu, Yildirim, Akpinar et al. del 2022, gli esosomi di caffè sono stati isolati utilizzando come materiale di partenza le bevande ottenute da semi verdi e da semi tostati, ipotizzando queste come le più comuni fonti di esosomi di caffè e quindi le responsabili degli effetti benefici degli stessi.

In questo studio, l'isolamento degli esosomi è avvenuto attraverso due metodi separati: la cromatografia di esclusione molecolare e l'utilizzo di un kit commerciale di isolamento. L'identificazione è stata effettuata utilizzando un microscopio a trasmissione elettronica (TEM) e un kit commerciale standard per la quantificazione. Successivamente l'identificazione è stata svolta utilizzando anche uno spettrofotometro UV-Visibile. Il TEM ha rivelato nanoparticelle sferiche con dimensioni di 40-100 nm. La presenza di esosomi in questa fase dimostra la loro straordinaria resistenza: prima di essere analizzati, i semi sono stati esposti per due volte ad alte temperature, tramite tostatura e infusione, come normalmente si svolge per ottenere la bevanda. Per completezza, è stato effettuato lo studio anche da estratti ottenuti da semi verdi che presentavano una maggior quantità di esosomi.

Durante questo studio è stato effettuato anche un sequenziamento dell'RNA esosomiale. Dopo la purificazione dell'RNA esosomiale associato alla cromatografia di esclusione molecolare, è stato effettuato un sequenziamento per indagare i microRNA presenti in queste vescicole. I microRNA (mRNA) sono RNA corti e non codificanti, sono lunghi da 18 a 22 nucleotidi e hanno un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica in fase post trascrizionale.

Per studiare i potenziali effetti benefici sulla salute umana, sono state utilizzate due linee cellulari umane differenti, una linea fibrotica (LX2) e una epatocellulare (HP40). Gli effetti dell'esposizione agli esosomi di caffè sono stati rilevati dopo 24 e 72 ore, per osservare le risposte precoci e tardive. Studi sulla linea LX2 hanno dimostrato che dopo 24 ore la proliferazione cellulare aumentava proporzionalmente alla concentrazione delle vescicole in soluzione in un range di 80-240 x 10<sup>6</sup> particelle/μL rispetto al gruppo di controllo mentre, al di sopra delle 560 x 10<sup>6</sup> non sono stati osservati miglioramenti significativi. Dopo 72 ore, gli effetti dell'esposizione rilevati non sono stati significativi rispetto al gruppo di controllo. Studi sulla linea HP40 hanno

mostrato, dopo 24 ore dall'esposizione agli esosomi di caffè, una diminuzione della proliferazione delle cellule rispetto al gruppo di controllo. Questi risultati sono conformi agli studi che hanno associato una relazione inversamente proporzionale tra il consumo di caffè (sia normale che decaffeinato) e la diffusione del tumore del fegato. Tuttavia, non è chiaro come l'effetto della somministrazione di un'alta concentrazione di esosomi non porti a un aumento proporzionale dell'effetto nelle cellule target. Per comprendere meglio questa risposta concentrazione-dipendente si è ipotizzato potesse dipendere dalle componenti degli esosomi stessi, in particolare dai microRNA trasportati.

Grazie al sequenziamento effettuato, sono state trovate 15 nuove sequenze di miRNA che sono state analizzate con tecniche di intelligenza artificiale, in particolare da un algoritmo che riesce a individuare i target di questi nuovi miRNA. I risultati hanno mostrato 2 geni target molto importanti, ZNF773 e KMT2C, che comportano l'aggravio della fibrosi epatica in malattie croniche al fegato. Questi studi dimostrano una relazione tra i trattamenti con gli esosomi e la risposta di questi geni, ipotizzando l'importanza di questi nella prevenzione della fibrosi epatica che, essendo una malattia progressiva, richiede importanti trattamenti preventivi nelle fasi iniziali. Per capire come i miRNA trasportati da queste vescicole siano in grado di influenzare la fibrosi epatica durante malattie croniche del fegato, Valadi et al. nel 2007 hanno dimostrato che gli esosomi provenienti da mastociti di topo, se aggiunti a colture cellulari contenenti mastociti umani, sono in grado di fondersi con le cellule umane provocando in queste la produzione di proteine di topo. Lo stesso meccanismo potrebbe essere valido per gli esosomi di caffè in quanto molti ricercatori hanno suggerito che le particelle derivate da esosomi vegetali siano in grado di fondersi con le cellule di specie differenti e di condizionarne il metabolismo.

Inoltre, Chuang et al. hanno proposto nel 2017 una associazione tra il consumo di caffè e il livello di metilazione di alcuni geni. Questi autori hanno evidenziato che, in alcune persone affette da malattie epatiche, alcuni geni che presentano regioni CpG (contenenti citosina e guanina), a seguito del consumo di caffè, sono metilati in maniera differente rispetto al gruppo di controllo.

## 1.11 Colture *in vitro* di cellule e tessuti vegetali per ottenere esosomi

Le tecniche di coltura *in vitro* permettono la crescita e la proliferazione di cellule eucariotiche e procariotiche, tessuti e organi in un mezzo di coltura contenente i nutrienti necessari alla loro sopravvivenza, in condizioni di sterilità e in ambiente controllato. In particolare, questa tecnica può essere utilizzata per la coltura di cellule animali, vegetali, fungine e microbiche.

Prendendo in considerazione colture di cellule vegetali, questa tecnica sfrutta la capacità rigenerativa di queste cellule che possono essere:

- Totipotenti: le cellule sono in grado di riprodurre tutti i tipi cellulari che compongono la pianta adulta, proprietà propria delle cellule zigotiche.
- Pluripotenti: le cellule sono in grado di riprodurre quasi tutti i tipi cellulari che compongono la pianta adulta, proprietà delle cellule meristematiche.
- Multipotenti: le cellule sono in grado di riprodurre più di un tipo cellulare.
- Unipotenti: le cellule sono in grado di riprodurre solo un tipo cellulare.

Già dagli anni '60 è noto che singole cellule somatiche, già differenziate, possono riacquisire la totipotenza se sottoposte a determinate condizioni di temperatura e composizione del terreno di coltura in termini di micronutrienti, macronutrienti e ormoni. Sono proprio queste condizioni che permettono la rigenerazione cellulare durante le colture cellulari partendo da porzioni cellulari (espanti) o da singole cellule e ripristinando la totipotenza nelle cellule già differenziate. Questa tecnica è alla base della micropropagazione (moltiplicazione vegetativa *in vitro* per ottenere cloni identici), dell'ibridazione somatica, dell'embriogenesi somatica e della trasformazione genica.

I processi sfruttati nelle tecniche di coltura *in vitro* e strettamente connessi alla totipotenza sono il dedifferenziamento e la rigenerazione. Il dedifferenziamento è il processo attraverso il quale le cellule differenziate escono dalla fase G<sub>0</sub> e rientrano nel ciclo mitotico riacquisendo le proprietà proprie delle cellule meristematiche. La rigenerazione è la capacità delle cellule singole di generare organi o interi individui.

I frammenti di pianta utilizzati per avviare una coltura *in vitro* sono detti espanti e possono essere ottenuti da ogni parte della pianta, tuttavia, si preferisce utilizzare materiale derivante da tessuti del corpo primario della parte aerea poiché è importante che le cellule dell'espanto siano giovani, vitali e che presentino la minor contaminazione possibile da microrganismi. Prima di essere sterilizzato, il materiale deve essere accuratamente lavato con acqua corrente e sapone. La sterilizzazione è una fase critica perché deve garantire l'eliminazione dei microrganismi sulla superficie del materiale vegetale senza danneggiare le cellule. Solitamente la sterilizzazione

avviene attraverso un'immersione in etanolo e una in ipoclorito di sodio con tensioattivi per penetrare più a fondo la superficie del materiale. Successivamente, vengono effettuati molti risciacqui con acqua distillata sterile per rimuovere i residui degli agenti sterilizzanti. I campioni vengono frammentati con pinzette e bisturi sterili e gli espianti che ne derivano vengono posti nei rispettivi mezzi colturali. Inoltre, per evitare la contaminazione dei campioni tutte queste operazioni vengono effettuate sotto una cappa a flusso laminare orizzontale sterilizzata con alcool e radiazioni UV.

Uno dei fattori principali che regolano la crescita e la morfogenesi delle colture *in vitro* è la composizione del mezzo colturale. Si tratta di una soluzione acquosa contenente microelementi, macroelementi, vitamine e zuccheri che garantiscono la sopravvivenza e lo sviluppo delle cellule vegetali, avvicinando le condizioni nutrizionali della coltura a quelle *in vivo*. Possono essere aggiunti anche regolatori di crescita (ormoni), aminoacidi o altre fonti di azoto, carbone attivo e agenti gelificanti. Gli agenti gelificanti sono utili per le colture che devono crescere su una superficie solida o semisolida (non in immersione). L'agar è il più utilizzato, solitamente ad una concentrazione del 0,5-1%, si ricava da molte specie di alghe rosse, non reagisce ai componenti del mezzo colturale e non viene digerito dagli enzimi vegetali. Altri polisaccaridi più raramente utilizzati come agenti gelificanti sono l'agarosio (purificato dell'agar), alginati (derivati dalla parete di alcune alghe brune) e phytogel (di derivazione batterica).

I regolatori di crescita vengono anche detti fitormoni o ormoni vegetali e hanno un ruolo fondamentale nelle colture *in vitro* poiché sono fortemente implicati nei processi di dedifferenziamento e morfogenesi. Questi effetti non sono solo causati dai regolatori di crescita esogeni, ma anche da quelli prodotti da ogni cellula (endogeni). I principali ormoni utilizzati nelle colture cellulari vegetali sono auxine e citochinine, oltre a questi possono essere spesso aggiunti anche gibberelline e acido abscissico. Il ruolo delle auxine e delle citochinine come regolatori di crescita e il loro legame con la morfogenesi fu evidenziato per la prima volta nel 1965 con gli studi di Skoog e Miller. Essi osservarono che su cellule indifferenziate (callo) ottenuto da fusti di tabacco, aumentando la concentrazione di auxina veniva stimolata la formazione di radici, aumentando la concentrazione di chinetina veniva stimolata la formazione di germogli; mentre a concentrazioni intermedie il callo rimaneva indifferenziato.

Le auxine promuovono la divisione e la distensione cellulare, l'embriogenesi somatica e la formazione di apici radicali (rizogenesi), perciò sono utilizzate per ottenere colture di radici e nella micropropagazione. Tuttavia, sia la rizogenesi che l'embriogenesi richiedono l'effetto delle auxine solo negli stadi iniziali di questi processi, in particolare nella fase di induzione e successivamente la loro presenza potrebbe avere un effetto inibitorio. L'auxina naturale più importante è l'acido



indol-3-acetico (IAA) tuttavia, data la termolabilità di questo composto si utilizzano auxine sintetiche con una stabilità maggiore come l'acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D), molto efficace nella formazione del callo (callogenesi).

Le citochinine stimolano la divisione cellulare, la formazione di apici caulinari (caulogenesi), di gemme laterali e inibiscono la rizogenesi. Le citochinine più utilizzate sono la chinetina e la 6-benzilaminopurina, entrambe sintetiche in quanto le citochinine naturali sono molto costose e poco stabili.

Le gibberelline e l'acido abscissico sono i regolatori meno usati nelle colture *in vitro* sebbene a volte il loro effetto sia essenziale. L'acido gibberellico ( $GA_3$ ) e la gibberellina più utilizzata ed è in grado di promuovere l'allungamento degli internodi, la fioritura e l'interruzione di dormienza di gemme, semi e bulbi. L'acido abscissico (ABA) è utilizzato per inibire o stimolare la crescita del callo, promuovere la crescita di gemme vegetative e inibire lo sviluppo embrionale nelle fasi tardive.

Una volta definita la composizione del mezzo di coltura, vengono aggiunti gli espianti che possono formare, nelle aree di taglio, delle masse di tessuto cicatriziale formato da cellule indifferenziate e non organizzate, detto callo. Dopo 20-30 giorni, il callo viene separato dagli espianti e trasferito in un nuovo mezzo colturale. Successivamente, attraverso la subcultura, cioè il trasferimento del callo in un nuovo mezzo colturale ogni 20-30 giorni, è possibile mantenere la proliferazione cellulare per un tempo indefinito.

Inoltre, il callo (meglio se di tipo friabile) può fungere da inoculo per avviare colture cellulari in mezzo liquido dette sospensioni cellulari. Vengono definite come sospensioni cellulari le popolazioni di cellule e piccoli aggregati cellulari (clumps) coltivati in un mezzo liquido e mantenuti in agitazione da un agitatore orbitale che previene l'aggregazione e garantisce aerazione e contatto continuo tra le cellule e le sostanze presenti nel mezzo di coltura. L'agitazione, generalmente tra i 100 e 120 rotazioni al minuto, fa in modo che il callo rilasci clumps e cellule singole nel mezzo liquido, le quali continueranno a crescere e dividersi. Dopo 2-3 settimane, il callo utilizzato da inoculo viene rimosso insieme ai clumps di maggiori dimensioni, ottenendo così una sospensione cellulare vera e propria, composta solo da cellule singole e clumps da meno di 100 cellule. Inoltre, è importante determinare la densità cellulare adeguata per garantire le condizioni ottimali per la sopravvivenza e la crescita delle cellule attraverso il rapporto tra la biomassa cellulare e il volume del mezzo colturale.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo di questa tesi è stato l'isolamento di esosomi ottenuti da colture cellulari di caffè su mezzo liquido, utilizzando delle metodologie semplificate e facilmente ripetibili, come filtrazione e centrifugazioni differenziali. Inoltre, è rilevante determinare la natura di queste frazioni per capirne l'origine da parte dei sistemi di membrana delle cellule vegetali. Le proteine intrinseche di membrana, nei diversi compartimenti della cellula vegetale, possiedono componenti peculiari che ne permettono l'identificazione nel plasmalemma, tonoplasto, reticolo endoplasmico e corpo di Golgi. La possibilità di riconoscere queste proteine, tramite tecniche immunologiche, rappresenta quindi una possibilità di identificarle come indicatori della provenienza cellulare degli esosomi. Queste determinazioni saranno molto utili nella caratterizzazione delle vescicole per capirne la potenzialità in utilizzi tecnologici futuri.

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Materiale vegetale di partenza**

Per tutti gli esperimenti il materiale utilizzato è stato ottenuto da foglie di *Coffea arabica* L. appartenenti alla cultivar Bourbon Red.

### **3.2 Colture cellulari di caffè**

Gli espianti sono stati ottenuti da foglie giovani di caffè, disinfettate attraverso diversi lavaggi con etanolo al 95%, ipoclorito di sodio e acqua distillata sterile per rimuovere i residui dei composti sterilizzanti. Successivamente si preparano dei dischetti fogliari aventi diametro di 5 mm, utilizzati come espianti da collocare sul terreno di coltura.

Si utilizza un terreno di coltura solido di tipo Murashige & Skoog (MS), il più utilizzato per le colture *in vitro* delle cellule vegetali, a cui viene aggiunto saccarosio, mioinositolo e agar come agente gelificante. Inoltre, per indurre la callogenesi, vengono aggiunti regolatori di crescita come auxine e citochinine, in particolare l'acido 2,4,5-triclorofenossiacetico e chinetina, entrambi alla concentrazione di 1 mg/L.

Gli espianti posti nel terreno di coltura vengono mantenuti al buio per 21 giorni a 28 °C, successivamente, tutto il materiale vegetale comprendente dischetti fogliari ed eventuale callo vengono trasferiti su un nuovo terreno per ulteriori 21 giorni. A questo punto, dopo che sono passati 42 giorni complessivi di coltura, il callo viene rimosso dal dischetto fogliare e viene trasferito nelle stesse condizioni ogni 21 giorni finché non si ottiene abbastanza materiale da utilizzare come inoculo per la sospensione cellulare. In questo caso, vengono utilizzati 2 g di callo (peso fresco) per l'inoculo della sospensione cellulare in una beuta, utilizzando 50 ml dello stesso terreno senza agar. Successivamente la beuta viene chiusa con un tappo in cellulosa e del cerotto traspirante e viene posta in un incubatore-agitatore orbitale a 28 °C, impostato a 110 rotazioni al minuto. Il tutto viene mantenuto al buio poiché l'esposizione alla luce potrebbe rappresentare una possibile fonte di stress e indurre la formazione di metaboliti secondari. Da questo momento in poi la sospensione cellulare viene trasferita ogni 14 giorni, prelevando 20 ml di sospensione nel terreno

di coltura e immettendola in una beuta contenente 30 ml di terreno di coltura fresco, per riottenere un volume totale di 50 ml, per evitare l'esaurimento dei nutrienti nel mezzo.

Tutte queste operazioni sono effettuate all'interno di una cappa a flusso laminare per evitare ogni contaminazione delle colture da parte di microrganismi.

### **3.2.1 Misurazione della crescita delle sospensioni cellulari**

Per la misurazione della crescita delle sospensioni cellulari viene utilizzata una curva di crescita, cioè la rappresentazione grafica della crescita di biomassa nel tempo, fondamentale per determinare il tempo intercorrente tra una subcultura e la successiva.

Le generiche fasi che caratterizzano una generica curva di crescita sono le seguenti:

-Fase di latenza: in questa fase (detta anche fase di lag) non si assiste ad un aumento del numero di cellule. Si tratta di una fase di adattamento in cui ci può essere un lieve aumento del volume cellulare.

-Fase esponenziale: in questa fase le cellule crescono e si dividono alla massima velocità possibile relativamente al loro potenziale genetico, alle condizioni di crescita e alla natura del terreno in cui sono state inserite.

-Fase stazionaria: in questa fase (detta anche fase di plateau) il numero totale di cellule vitali rimane costante. Può essere determinato dall'esaurimento dei nutrienti o ad un aumento di cataboliti presenti nel terreno.

-Fase di declino: quest'ultima fase è caratterizzata da una diminuzione delle cellule vitali nel tempo, dovuto a lisi cellulare e a perdita della capacità di riproduzione.

Perciò, la subcultura dovrebbe avvenire alla fine della fase di crescita lineare o all'inizio della fase stazionaria.

La costruzione della curva di crescita avviene rilevando periodicamente l'aumento della biomassa, attribuibile sia all'aumento del numero di cellule che all'aumento delle loro dimensioni, espresso come incremento del peso fresco, incremento del peso secco, incremento del numero di cellule e incremento del volume di cellule impaccate per le sospensioni cellulari. Per le colture in mezzo solido, la determinazione dell'incremento di peso fresco avviene prelevando e pesando il callo. Per quanto riguarda le sospensioni cellulari, è necessaria la separazione tra il mezzo colturale e le cellule tramite filtrazione o centrifugazione. Per la determinazione del peso secco, sia per colture cellulari in mezzo solido, sia per le sospensioni cellulari, viene fatta evaporare l'acqua presente nelle cellule esponendole a temperature di 60-80°C per 48-72 ore. L'incremento del

numero di cellule è valutato attraverso la conta diretta delle cellule al microscopio ottico utilizzando solitamente degli emocitometri o vetrini contaglobuli, inizialmente concepiti per la conta dei globuli rossi nel sangue. La crescita delle sospensioni cellulari si può esprimere anche attraverso l'incremento del volume di cellule impaccate o PCV. A tal fine, la sospensione viene centrifugata a 100-200 g per 5-10 minuti. Dopo la centrifugazione il mezzo colturale (surnatante) sarà ben distinguibile dalle cellule (pellet).

Per la misurazione della crescita delle sospensioni cellulari è stata prodotta una curva di crescita che esprime le progressive variazioni di peso fresco e di peso secco. Il materiale di partenza utilizzato per ottenere la curva è stato fornito dalle sospensioni cellulari dopo 14 giorni dalla terza subcultura. Si preparano 2 tesi per osservare l'andamento della curva di crescita utilizzando 2 diverse quantità di inoculo: per la tesi 1 (T1) si utilizzano 2,5 ml e per la tesi 2 (T2) si utilizzano 10 ml. Per la costruzione della curva di crescita, le rilevazioni del peso fresco e del peso secco vengono effettuate ogni 3-4 giorni per un periodo totale di 24 giorni, ottenendo così 8 misurazioni totali.

Il rilevamento del peso fresco viene effettuato prelevando 3 ml di sospensione cellulare per ogni tesi con rispettive ripetizioni. Questa viene posta in una provetta in cui è stato precedentemente posto un filtro per separare le cellule dal terreno di coltura. Le provette vengono poste in un rotore Sorvall sm 24 e centrifugate utilizzando la centrifuga Sorvall RC-5B per 10 minuti a 10.000 g. Le provette contenenti solo le cellule a questo punto vengono tolte dal rotore e pesate per la rilevazione del peso fresco. Il dato che poi sarà utilizzato per la costruzione della curva rappresenta una media delle 3 ripetizioni di ciascuna tesi.

Per il rilevamento del peso secco le provette vengono poste in stufa a 55°C per 24 ore per disidratare completamente le cellule. Dopo di che vengono nuovamente pesate e si seguono gli stessi step utilizzati per la costruzione della curva del peso fresco.

Un altro strumento di analisi delle colture cellulari *in vitro* è il saggio di vitalità cellulare, utile per discriminare le cellule vive da quelle morte. La percentuale di vitalità è ottenuta attraverso la formula  $(\text{numero cellule vive} / \text{numero cellule morte}) * 100$ . Per la valutazione della vitalità cellulare vengono utilizzati cromofori applicati alle cellule fresche, ad esempio l'acetato di fluorescina (FDA). Questo composto non fluorescente riesce a penetrare sia in cellule morte che vive, ma in queste ultime le esterasi citoplasmatiche idrolizzano l'FDA provocando la formazione di fluorescina, un composto fluorescente e altamente polare che si accumula nel citoplasma conferendo a quest'ultimo una fluorescenza verde o gialla. Perciò, il saggio con FDA è in grado di accertare sia l'integrità della membrana sia l'attività esterasica della cellula, garantendo la fluorescenza delle cellule vive, fondamentale per un conteggio preciso di queste ultime.

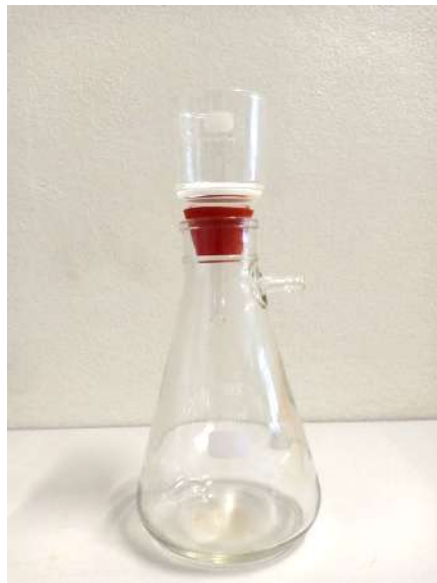
La vitalità cellulare viene rilevata utilizzando un microscopio a fluorescenza in cui vengono posti dei vetrini contenenti 190  $\mu$ l di sospensione cellulare e 10  $\mu$ l di una soluzione di FDA ottenuta come segue: è stata preparata una soluzione madre al 0,5% di FDA in acetone che è stata poi diluita 1:20 in PBS 1x. 2  $\mu$ l di questa sono stati addizionati a 0,1 ml di CSC (Cell Suspension Culture) in una eppendorf e solubilizzata per 5 minuti al buio e a temperatura ambiente.

### 3.3 Tecniche di isolamento degli esosomi

Al fine di facilitare gli studi e le applicazioni degli esosomi, questi devono essere accuratamente separati da una grande quantità di frammenti cellulari e altre sostanze che potrebbero interferire con il buon esito dell'isolamento. Per questo, le tecniche di separazione devono avere un'alta efficienza e versatilità di utilizzo, per poter isolare gli esosomi anche da matrici molto diverse. Ad oggi, sono state sviluppate cinque differenti tecniche di isolamento degli esosomi, basate sull'ultracentrifugazione differenziale, la filtrazione, l'immunoaffinità, la precipitazione degli esosomi e sulla microfluidica.

#### 3.3.1 Filtrazione

Durante la prima fase di isolamento, la sospensione cellulare di 14 giorni è stata filtrata utilizzando un filtro di vetro sinterizzato Schott duran 3 con pori di dimensione di 1  $\mu\text{m}$  (Fig. 5). Utilizzando una pompa a vuoto è stata creata una leggera depressione a valle del filtro, permettendo di escludere con efficacia le componenti in base alla loro dimensione, in questo caso cellule vive, cellule morte e frammenti cellulari. Questa tecnica è più veloce dell'ultracentrifugazione, ma dipendentemente dalla forza di suzione (o pressione nei filtri a pressione) ci possono essere delle contaminazioni del campione dovute alla deformazione e alla rottura di vescicole di grandi dimensioni.



**Fig. 5:** Sistema di filtraggio con filtro Schott duran 3

### 3.3.2 Centrifugazioni

Dopo la filtrazione, l'isolamento procede con una serie di centrifugazioni della frazione non cellulare ottenuta dalla sospensione, che permettono alle differenti componenti della soluzione di sedimentare in base alla loro densità, dimensioni e forma. Questo è reso possibile dalla progressiva separazione del pellet e del surnatante utilizzando centrifugazioni progressivamente più veloci, dipendentemente dalla densità e viscosità del solvente. L'utilizzo delle ultracentrifugazioni per l'isolamento degli esosomi è largamente diffuso: la maggior parte delle ricerche sugli esosomi utilizza questa tecnica, poiché è relativamente semplice da compiere, non costosa, non richiede tempi troppo lunghi e non richiede il trattamento dei campioni.

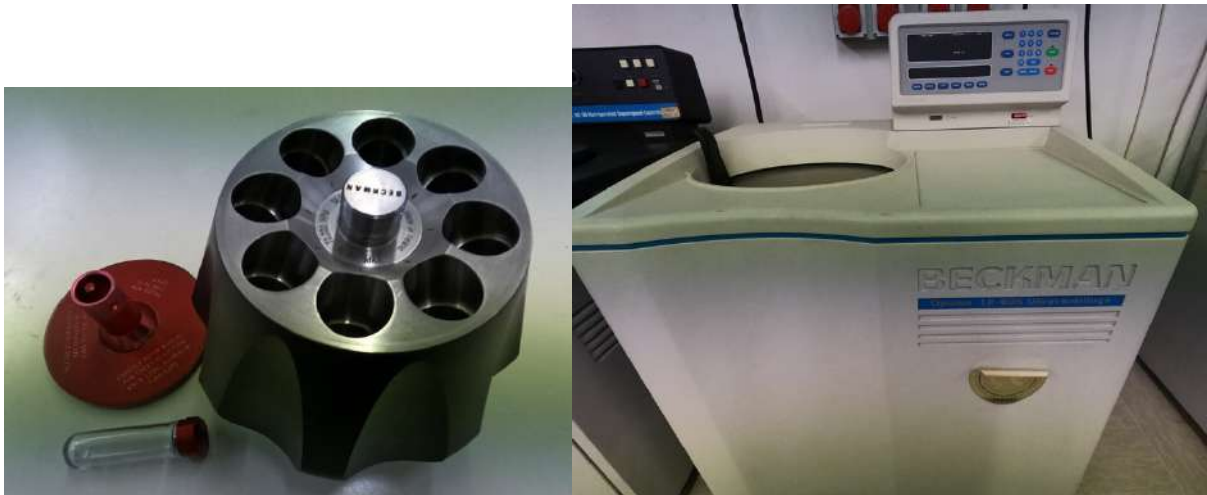
La soluzione filtrata in precedenza è stata sottoposta ad una serie di centrifugazioni preparative per rimuovere le componenti di grandi dimensioni che potrebbero ancora essere presenti nel campione. Utilizzando una supercentrifuga Sorvall RC-5B e un rotore Sorvall sm24 (Fig. 6), la soluzione è stata centrifugata a 3000 g per 6 minuti per rimuovere eventuali cellule morte. Il surnatante è stato centrifugato per 12 minuti a 12000 g per sedimentare e rimuovere eventuali frammenti cellulari e corpi apoptotici.



**Fig. 6:** Centrifuga Sorvall RC-5B e rotore Sorvall sm24



Il surnatante collezionato dalle centrifugazioni preparative è stato poi purificato utilizzando una serie di ultracentrifugazioni differenziali per pellettare le vescicole più piccole, corrispondenti agli esosomi. Le seguenti centrifugazioni sono state effettuate utilizzando un'ultracentrifuga Beckman Optima LE-80k con un rotore ad angolo fisso Beckman TYPE 70 Ti (Fig. 7).



**Fig. 7:** Ultracentrifuga Beckman Optima LE-80k e rotore Beckman TYPE 70 Ti

La prima ultracentrifugazione ha avuto una durata di 36 min a 100'000 g. Il surnatante è stato separato dal pellet e nuovamente ultracentrifugato per 6 h a 125'000 g. Conclusa questa centrifugazione, il surnatante è stato separato da pellet e conservato. Entrambi i pellet ottenuti dalle centrifugazioni di 36 min e di 6 h sono stati conservati e risospesi in 0,7-1,5 ml PBS (*Phosphate-buffered saline*) con aggiunta di 0,25 M trealosio, utilizzando un omogeneizzatore di tipo Potter-Elvehjem per rimuovere gli aggregati più grossolani. Per semplicità, la frazione ottenuta dopo 36 min a 100'000 g è stata indicata con la sigla F36 mentre, la frazione ottenuta dopo 6 h di centrifugazione a 125'000 g come F6.

L'utilizzo di ultracentrifugazioni differenziali per l'isolamento degli esosomi può portare all'aggregazione delle particelle in sospensioni molto concentrate. Inoltre, la crioconservazione dei campioni purificati può danneggiare le vescicole e causare una diminuzione significativa dell'attività biologica. Il trealosio è uno zucchero naturale e atossico, utilizzato largamente nell'industria alimentare e farmaceutica come stabilizzatore proteico e crioprotettore. Come riportato dagli studi di Bosch et al., l'aggiunta di 0,25 M trealosio al PBS previene l'impaccamento delle cellule e aumenta la quantità di particelle singole per microgrammo di proteina. Inoltre, previene l'aumento di concentrazione e la disuguaglianza dimensionale di queste vescicole dovuto a congelamenti e scongelamenti ripetuti.

Dopo la risospensione del pellet, i campioni vengono conservati in congelatore a -20 °C.

### 3.4 Determinazione della quantità di proteina del campione

Per stimare la quantità di proteina in una soluzione è stato utilizzato il saggio di Bradford (1976), che utilizza una soluzione contenente il colorante Coomassie Brilliant Blue G-250. Questo colorante vira dalla colorazione ramata al blu in base alla quantità di proteina presente nella soluzione poiché il legame tra il Coomassie Brilliant Blue G-250 e le proteine determina uno spostamento del picco di assorbimento del colorante da 465 nm a 595 nm. Il viraggio di colorazione del colorante da rosso-ramato a blu in presenza di proteine è possibile per la formazione di complessi non covalenti tramite interazioni elettrostatiche con amminoacidi basici (positivi) ed interazioni idrofobiche con amminoacidi aromatici.

In una piastra a 96 pozzetti trasparente e a fondo piano vengono caricati i campioni per un volume di 200 µl a pozzetto lasciando liberi i pozzetti perimetrali. Il saggio di Bradford viene applicato al pellet risospeso in PBS e trealosio dopo la centrifugazione di 36 min, al pellet risospeso in PBS e trealosio dopo la centrifugazione di 6 h e al surnatante della centrifugazione di 6 h, ognuno con i rispettivi controlli per poter sottrarre l'assorbanza del controllo a quella del campione. Su ogni riga vengono caricate 3 ripetizioni dello stesso campione mentre nelle colonne avremo dall'alto verso il basso:

- Controllo F36: PBS+Trealosio 20µl + Coomassie Brilliant Blue 180µl
- F36: Risospensione del pellet F36 20 µl + Coomassie Brilliant Blue 180µl
- Controllo F6: PBS+Trealosio 20 µl + Coomassie Brilliant Blue 180µl
- F6: Risospensione del pellet F6 20 µl + Coomassie Brilliant Blue 180µl
- Controllo surnatante: Terreno di coltura utilizzato per le colture cellulari d'origine 100 µl + Coomassie Brilliant Blue 100 µl
- Surnatante: Surnatante di F6 100 µl + Coomassie Brilliant Blue 100 µl

Utilizzando un lettore di micropiastre Perkin Elmer Victor 3 (Fig. 8) e determinando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm, viene ricavata l'assorbanza per tutti i campioni presi in analisi e ne viene calcolata la media. Il valore di concentrazione di proteina è stato ricavato utilizzando una curva di taratura ottenuta utilizzando diverse soluzioni a concentrazioni note di BSA (*Bovine Serum Albumin* – Albumina di Siero Bovino), utilizzata come proteina standard, e i valori di assorbanza relativi alle diverse soluzioni. I valori ottenuti per le frazioni F36 e F6 sono stati mediati da una retta con la seguente equazione:

$$y = 0,8821x - 0,0103$$

Mentre per la rilevazione della proteina presente nel surnatante, essendo maggiormente diluita, i dati sono stati mediati con la seguente curva:

$$y = 0,012x - 0,0054$$

Per ricavare la quantità di proteina nella soluzione in mg/ml è stato sostituito il valore della media dell'assorbanza nell'asse delle ordinate e, risolvendo l'equazione inversa, è stato ottenuto il valore della quantità di proteina presente nella soluzione.



**Fig. 8:** Lettore di micropiastre Perkin Elmer Victor 3

### **3.5 Determinazione delle dimensioni delle particelle e del potenziale Zeta**

Per determinare le dimensioni delle particelle e il potenziale  $\zeta$  è stato utilizzato il saggio di diffusione dinamica della luce (DLS, *Dynamic Light Scattering*) con lo strumento NICOMP 380 ZLS *Particle Sizer* (Fig. 9).

Questa tecnica viene utilizzata per determinare il profilo di distribuzione di particelle nanometriche in sospensione e si basa sulla dispersione della luce, quando colpisce particelle molto piccole (più piccole della lunghezza d'onda utilizzata, solitamente di 250 nm).

Il DLS si basa sul moto Browniano delle particelle in fluidi o sospensioni fluide o gassose come il fumo, le quali si muovono in maniera casuale in tutte le direzioni. Il principio alla base del moto Browniano è il continuo scontro tra queste particelle e le molecole del solvente, questi scontri trasferiscono energia alle particelle che si traduce in moto. Sebbene l'energia trasferita alle particelle sia praticamente costante, il suo effetto è maggiormente apprezzabile in particelle di

piccole dimensioni; perciò, queste ultime si muoveranno più velocemente di quelle di dimensioni maggiori. Per la prima legge di Stokes-Einstein, conoscendo i valori delle variabili che possono influenzare il moto delle particelle, ad esempio temperatura e viscosità del solvente, possiamo conoscere il diametro idrodinamico della particella semplicemente misurandone la velocità.

I campioni utilizzati in questo studio sono stati preparati aggiungendo alle frazioni F6 e F36 2,9 ml acqua bidistillata. Successivamente, i campioni sono stati inseriti in una cuvetta trasparente e inseriti nello strumento per l'analisi delle dimensioni e del potenziale  $\zeta$ . Il potenziale  $\zeta$ , o potenziale elettrocinetico, è generato dalla formazione di un doppio strato elettrico. Un valore elevato di potenziale  $\zeta$  conferisce maggiore stabilità ai sistemi colloidali, poiché le repulsioni elettrostatiche impediscono l'aggregazione delle particelle disperse. Se il potenziale è basso, prevalgono le forze attrattive e si possono verificare processi quali la coagulazione e la flocculazione.



**Fig. 9:** NICOMP 380 ZLS Particle Sizer

### 3.6 Elettroforesi

La caratterizzazione proteica degli esosomi di caffè è stata determinata attraverso l'elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE). Questa tecnica permette la separazione delle proteine presenti nei campioni sfruttando la migrazione delle proteine caricate negativamente all'interno del gel, in cui è applicato un campo elettrico.

Per la preparazione dei gel e della corsa elettroforetica vengono preparati i seguenti tamponi e le seguenti soluzioni:

- Tris-glicina (500 ml): Glicina 7,2 g, Tris 1,5 g
- Tris-glicina-SDS (150 ml): In 150 ml di Tris-glicina vengono aggiunti 0,15 g di SDS (SDS 0,1%)
- Tampone R (50 ml): Glicerolo (75%) 37,5 g
- Tampone M (50 ml): 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 3g; 0,4 % SDS 0,2 g
- Tampone L (50 ml): 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) 9 g; 0,4% SDS 0,2 g
- Soluzione NPS (5 ml): NPS 1g

Preparazione dei gel:

**Running gel al 12%** (20 ml): 5 ml Tampone L, 8,9 ml acqua bidistillata, 6 ml Acrilogel 40%, 100  $\mu$ l NPS e 6  $\mu$ l Temed.

Circa 6,5 ml di questa soluzione sono stati versati con delicatezza all'interno dello stampo per elettroforesi, precedentemente posizionato sull'apposito supporto. Vengono poste alcune gocce di alcool isobutilico sopra la soluzione appena inserita per livellare il lato superiore del gel. Avvenuta la gelificazione, vengono rimossi l'alcool e l'acqua di spurgo del gel attraverso dei lavaggi con acqua bidistillata, poi i vetrini vengono asciugati nella parte interna con carta assorbente bibula.

**Stacking gel:** 2 ml Tampone M, 1 ml Tampone R, 4,2 ml acqua bidistillata, 0,8 ml Acrilogel 5 %, 40  $\mu$ l NPS e 6  $\mu$ l Temed.

Questa soluzione è stata versata con delicatezza tra i vetrini e sopra al Running gel, lasciando circa 2 mm dal bordo superiore dei vetrini. Viene inserito subito il pettine di plastica per la formazione dei pozzetti di caricamento. Una volta avvenuta la gelificazione il pettine viene rimosso.

Preparazione dei campioni:

Per un gel di spessore 1,5 mm i campioni vengono preparati utilizzando:

5  $\mu$ l Blu di bromofenolo, 5  $\mu$ l Tampone R, 5  $\mu$ l Tampone M, 5  $\mu$ l SDS 10 % (p/v) e 30  $\mu$ l di ogni campione.

A questo punto, tutti i campioni sono stati caricati all'interno dei pozzetti, facendo attenzione a non occupare quelli esterni.

La preparazione preliminare dei campioni è avvenuta come segue:

I campioni comprendono un controllo composto dalle cellule di caffè, dalla risospensione del pellet ottenuto dopo 36 minuti di centrifugazione (F36) e del pellet ottenuto dopo 6 ore di centrifugazione (F6). Al campione delle cellule, inoltre, è stata aggiunta anche 4 M urea e 5  $\mu$ l di Mercaptoetanolo, due composti che migliorano la disaggregazione e la solubilizzazione proteica. I campioni sono stati poi immersi per 5 minuti in acqua a 65 °C; solo nel caso delle cellule, si procede con una centrifugazione per pochi secondi per far precipitare le componenti più grossolane e poter utilizzare il surnatante.

I campioni possono essere diluiti per ottenere la stessa quantità proteica in ogni campione, utilizzando i dati ottenuti dal saggio di Bradford.

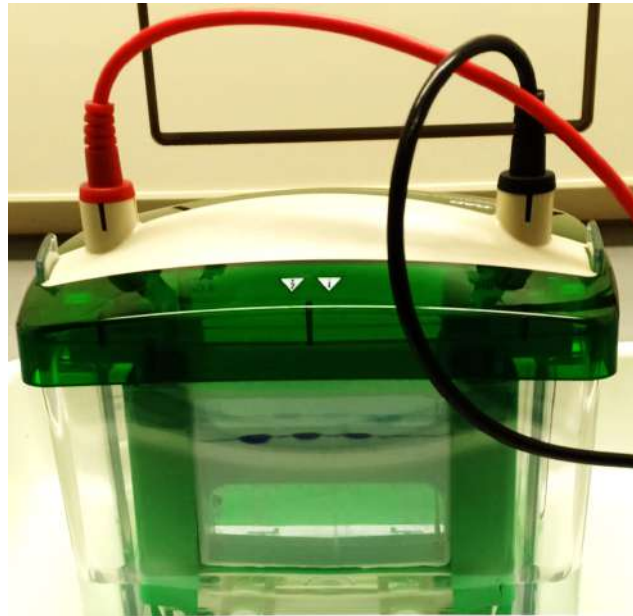
L'ordine di caricamento dei campioni all'interno del gel è il seguente: Cellule, F36 e F6 (Fig. 10).

Preparazione della corsa elettroforetica:

Il tampone Tris-glicina-SDS viene versato delicatamente nello spazio interno delimitato dai vetrini per l'elettroforesi fino all'interno dei vetrini stessi. Il resto del tampone Tris-glicina (350 ml) viene versato nella vaschetta in cui sono inseriti i vetrini per la corsa elettroforetica. Infine, si chiude la vaschetta contenente i tamponi e i gel, vengono collegati gli elettrodi e viene applicata una corrente di 30 mA se è presente solo un gel, 40-50 mA invece vengono utilizzati per corse con due gel in contemporanea.

Avvenuta la corsa i gel contenuti nei vetrini vengono separati dai tamponi, viene rimosso il vetrino di copertura e si rimuove lo Stacking Gel con un bisturi lungo la linea di congiunzione dei gel. Viene rimosso l'angolo in alto a sinistra del Running Gel per avere sempre il riferimento del verso e viene versato in 100 ml di acido acetico 7,5% mantenuto in agitazione per 6-7 minuti. Dopodiché il gel viene rimosso dalla soluzione di acido acetico per essere lasciato tutta la notte in agitazione in una soluzione di Blu di Coomassie.

Il giorno successivo dopo diversi lavaggi con acqua sono visibili le bande proteiche all'interno del gel.



**Fig.10:** Svolgimento della corsa elettroforetica

### 3.7 Western blot

Il Western blot (o Immunoblotting) è una tecnica molto sensibile che permette l'identificazione e la caratterizzazione proteica attraverso le tecniche di SDS-PAGE e le interazioni anticorpo-antigene. La grande capacità di risoluzione del Western blot è determinata dalla combinazione di elettroforesi per la separazione proteica e l'alta specificità degli anticorpi per l'identificazione.

Per la preparazione delle operazioni di immunoblotting vengono richieste le seguenti soluzioni:

- Tampone di trasferimento (200 ml): 0,6 g Tris, 2,88 g Glicina e 40 ml Metanolo.
  
- Soluzione Rosso Ponceau S (100 ml): Rosso Ponceau S 0,2 g, Acido acetico 5ml
  
- TBS Tris-Buffer Saline (2 l): 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) (2,42 g) e 150 mM NaCl (17,52 g)
  
- Tampone di saturazione (100 ml): 100 ml TBS e 3 % (p/v) BSA (3 g)
  
- Tampone di incubazione dell'anticorpo primario e secondario (35 ml): 35 ml TBS, 0,05% Tween 20 (143 µl), 0,5 % (p/v) BSA (0,175 g)
  
- Tampone di lavaggio dell'anticorpo primario e secondario (400 ml): 400 ml TBS e 0,05 % (v/v) Tween 20 (0,2 ml)
  
- Tampone di sviluppo (10 ml): da preparare poco prima dell'uso. In un beaker coperto da carta stagnola viene sbriciolata una Tablets (Sigma B-5655), vengono aggiunti 10 ml di acqua bidistillata e viene coperto con carta stagnola poiché la soluzione è sensibile alla luce.
  
- Preparazione del gel, della membrana di nitrocellulosa e dei filtri: Il protocollo utilizzato per il trasferimento delle proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa è stato quello del "semi-dry immunoblotting". Il gel viene rimosso dalla cella per elettroforesi e viene messo ad equilibrare per 30 minuti nel tampone di trasferimento. Separatamente, lo stesso trattamento è stato eseguito per la membrana di nitrocellulosa e per i filtri.



-Preparazione della cella di trasferimento: Viene utilizzato la cella di trasferimento Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Fig. 11). Sulla piastra della cella si stendono, nel seguente ordine, un filtro, la membrana di nitrocellulosa il gel ed il secondo filtro. Ogni volta che un elemento viene aggiunto si utilizza una provetta di vetro cilindrica per rimuovere le bolle d'aria che si possono formare, basterà farla rotolare con una leggera pressione.

-Trasferimento: Per far avvenire il trasferimento le proteine dal gel alla membrana di nitrocellulosa viene chiuso lo strumento e viene collegato al generatore con le impostazioni di 15 V, 250 mA per circa 1 ora e 30 minuti.

-Colorazione con Rosso Ponceau S: Dopo che la membrana di cellulosa è stata rimossa dalla cella di trasferimento è stato tagliato l'angolo in alto a sinistra per riferimento (come nel gel) e viene immerso nella soluzione di Rosso Ponceau S per circa 10 minuti. Questo permette l'identificazione delle bande proteiche, con una matita tenera vengono segnati dei puntini in corrispondenza delle estremità di tutte le corse elettroforetiche.

-Lavaggio del colorante: Per l'eliminazione della colorazione rossa sono stati eseguiti 3 lavaggi della membrana in TBS fino alla scomparsa delle bande.

-Saturazione della membrana di nitrocellulosa: Al fine di saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è stata immersa nel tampone di saturazione e lasciata in agitazione per 1 ora.

-Primo lavaggio: A saturazione completata, la membrana è stata lavata 3 volte con TBS

-Incubazione con l'anticorpo primario: Terminato il lavaggio, la membrana è stata posta in incubazione con l'anticorpo primario e lasciata per tutta la notte in agitazione.

-Secondo lavaggio: La membrana è stata lavata 4 volte utilizzando un volume totale di 200 ml per 20 minuti.

-Incubazione con l'anticorpo secondario: Terminato il lavaggio, la membrana è stata posta in incubazione con l'anticorpo secondario per circa 1 ora e 30 minuti a 37 °C.

-Terzo lavaggio: La membrana è stata lavata 3 volte utilizzando un volume totale di 150 ml di tampone di lavaggio e 2 volte utilizzando 100 ml totali di TBS per un tempo totale di 30 minuti.

-Sviluppo: viene preparato il tampone di sviluppo nel quale è stata immersa la membrana di nitrocellulosa. Durante la fase di sviluppo delle bande, è stato controllato la colorazione della membrana bloccando il processo con acqua distillata non appena la colorazione ha raggiunto l'intensità voluta.

I campioni sono stati caricati all'interno del gel nel seguente ordine: Standard molecolari, Cellule, F36, F6, Cellule, F36, F6 e Standard molecolari. Sono stati utilizzati gli standard molecolari della ditta Thermo Scientific (*PageRuler Prestained Protein Ladder*). A corsa avvenuta, è stato eseguito il protocollo di Western blotting fino al primo lavaggio.

In questa prova sono stati utilizzati i seguenti anticorpi policlonali ottenuti commercialmente con le seguenti diluizioni:

- Agrisera AS07 260 H<sup>+</sup>ATPasi con diluizione 1:2000
- Agrisera AS07 213 V-ATPasi con diluizione 1:1000
- Agrisera AS08 327 Sec21p con diluizione 1:1000
- Agrisera AS12 2365 CNX1/2 con diluizione 1:2000

La caratterizzazione delle componenti legate alla membrana di queste vescicole è stata ottenuta utilizzando anticorpi policlonali in grado di avere una *cross-reactivity* con proteine di *Arabidopsis thaliana* ma, essendo policlonali, sono in grado di riconoscere proteine simili in altre specie, in questo caso ottenute da culture cellulari di caffè.

Questi anticorpi permettono di rivelare le componenti che caratterizzano i diversi tipi di membrane da cui queste vescicole potrebbero aver avuto origine grazie alla loro alta identificazione e selezione proteica. In particolare, l'anticorpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma utilizza un antigene derivato da ATPasi di plasmalemma in grado di riconoscere proteine omologhe di dicotiledoni, monocotiledoni, felci, muschi e alghe; l'anticorpo anti-V-ATPasi identifica la subunità E dell'H<sup>+</sup>ATPasi di vacuolo; l'anticorpo anti-Sec21p riconosce una delle componenti associate al Golgi di *Arabidopsis* e, infine, l'anticorpo anti-CNX1/2, ottenuto contro calnessina 1 e 2 di *Arabidopsis*, riconosce proteine associate al reticolo endoplasmico.

Dopo una notte in incubazione con i diversi anticorpi primari e dopo il lavaggio, le membrane sono state incubate in presenza di anticorpi secondari per circa 1 ora e 30 minuti. Sono stati utilizzati anticorpi *anti-rabbit* coniugati alla fosfatasi alcalina con una diluizione di 1:5000.

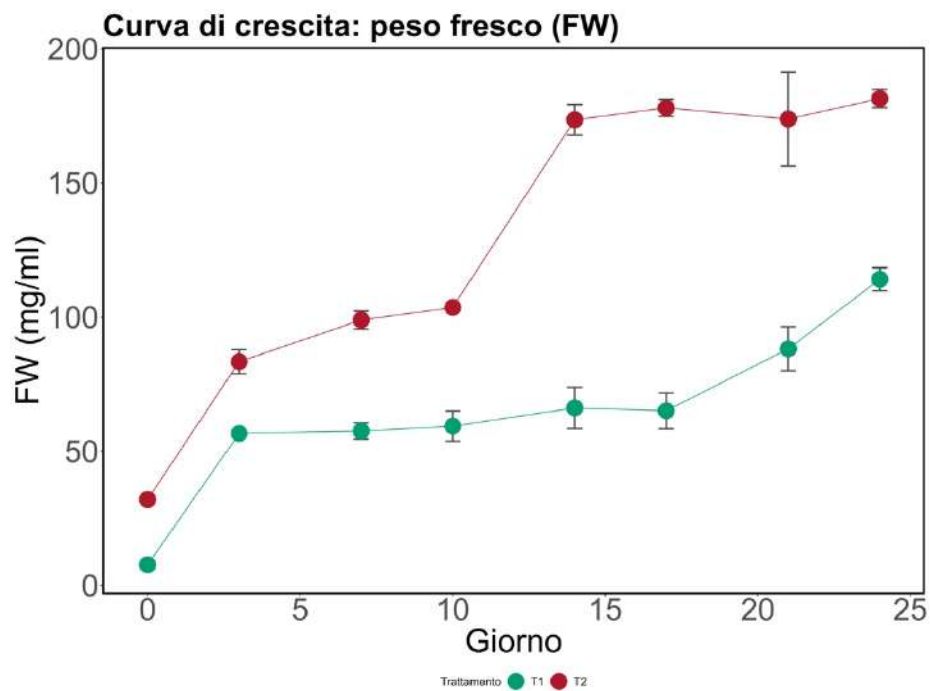


**Fig. 11:** Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Curve di crescita della sospensione cellulare

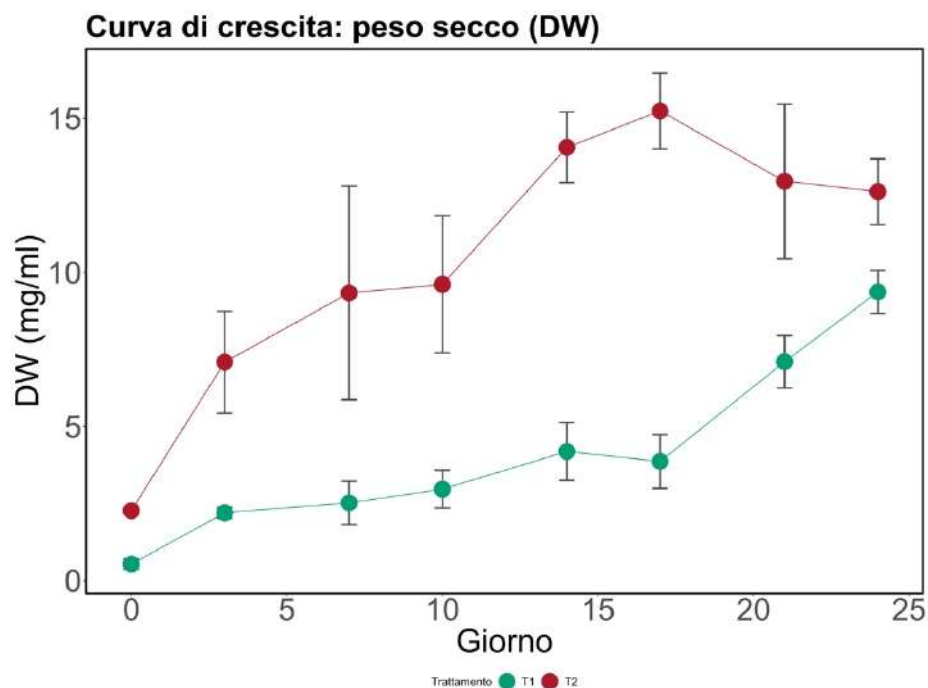
La costruzione della curva di crescita è fondamentale per avere una rappresentazione grafica dell'aumento di biomassa nel tempo, e quindi della crescita delle sospensioni cellulari. Con questa prova si vuole osservare come due differenti dosi di inoculo possano condizionare la crescita delle sospensioni: nella Tesi 1 (T1) si utilizzano 2,5 ml di sospensione come inoculo di partenza e nella Tesi 2 (T2) ne vengono utilizzati 10 ml. In questo caso la curva è costruita rilevando periodicamente il peso fresco e il peso secco delle sospensioni cellulari delle diverse tesi.



**Fig. 12:** Curva di crescita del peso fresco (FW)

Nella curva di crescita del peso fresco (Fig. 12) è possibile notare come le fasi lag delle due curve siano molto diverse, nella Tesi 1 la durata di questa fase è di 17 giorni e non si assiste ad un aumento di volume cellulare significativo mentre, la fase lag della Tesi 2 ha una durata di 10 giorni e si assiste ad un aumento di volume cellulare di circa 20 mg/ml negli ultimi 7 giorni. Nella curva

relativa alla Tesi 1, la fase esponenziale ha una durata di 7 giorni e provoca un aumento complessivo di biomassa di 49 mg/ml, in particolare da 65 mg/ml rilevati il giorno 17 ai 114 mg/ml rilevati il giorno 24. Vista la durata della fase lag della Tesi 1, non è stato possibile creare una curva che mostri la durata complessiva della fase esponenziale e delle seguenti fasi. La curva relativa alla Tesi 2 mostra una fase esponenziale di 4 giorni, con un aumento complessivo di biomassa di 70 mg/ml, passando dai 103 mg/ml rilevati il giorno 10 ai 173 mg/ml rilevati il giorno 14. La curva prosegue nella fase stazionaria fino alla fine della prova senza variazioni significative di biomassa.



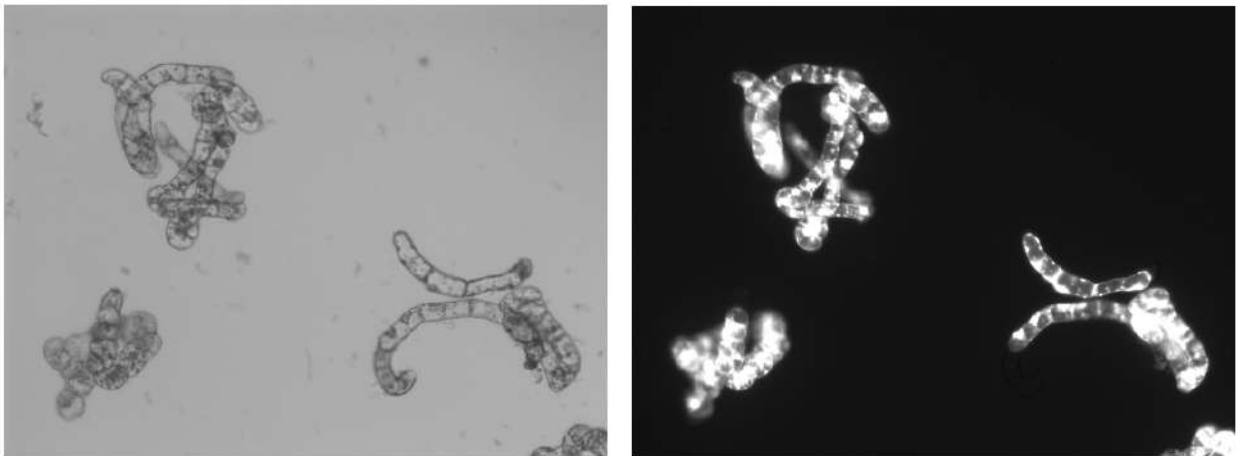
**Fig. 13:** Curva di crescita del peso secco (DW)

Nella curva relativa alle variazioni di peso secco (Fig. 13) si osserva che, mentre la durata della fase lag delle due curve segue l'andamento delle curve descritte per il peso fresco, l'incremento di biomassa totale per la curva T2 è di 7,3 mg/ml e, anche per la curva T1, si osserva un incremento di biomassa di circa 3,3 mg/ml. Nella curva T1, la fase esponenziale viene osservata dal giorno 17 al giorno 24 e provoca un incremento ponderale di 5,5 mg/ml. Per quanto riguarda la curva T2, la fase esponenziale viene osservata dal giorno 10 al giorno 14 e provoca un incremento di 4,4 mg/ml, proseguendo con una pendenza inferiore fino al giorno 17 comportando un incremento complessivo di 5,6 mg/ml. Proseguendo con l'osservazione della curva si nota la

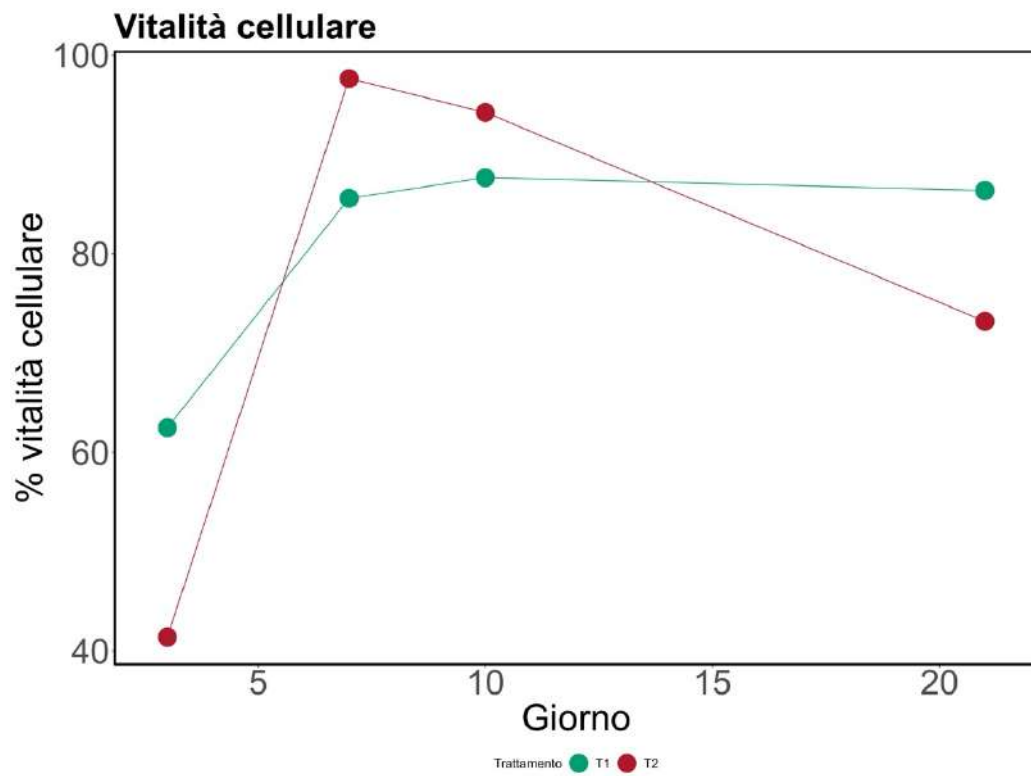
mancanza di una fase stazionaria, infatti, già dal giorno 17 si osserva una fase di declino che porta ad una diminuzione di peso secco di circa 2,62 mg/ml fino al giorno 24.

## 4.2 Saggio di vitalità cellulare

Con questa prova si è osservata la percentuale di vitalità cellulare delle sospensioni cellulari T1 e T2, attraverso l'osservazione con un microscopio a fluorescenza prima nello spettro del visibile e poi in fluorescenza, fondamentale per osservare con facilità la vitalità delle cellule (Fig. 14). I dati sono stati raccolti nel giorno 3, nel giorno 7, nel giorno 10 e nel giorno 21 per ottenere una rappresentazione della progressiva variazione di vitalità cellulare nelle sospensioni (Fig. 15). Nella curva relativa alla percentuale di vitalità della Tesi 1 si può osservare un progressivo aumento di vitalità cellulare, da un minimo di 62,5 % nel giorno 3 ad un massimo di 88 % nel giorno 10 che rimane stabile fino al giorno 21. Nella curva relativa alla Tesi 2 si può osservare un aumento della percentuale di vitalità cellulare da un minimo di 41,5 % nel giorno 3 ad un massimo di 97,5 % nel giorno 10. La curva poi diminuisce lievemente fino al giorno 10 e al giorno 21 presenta un valore del 73%.



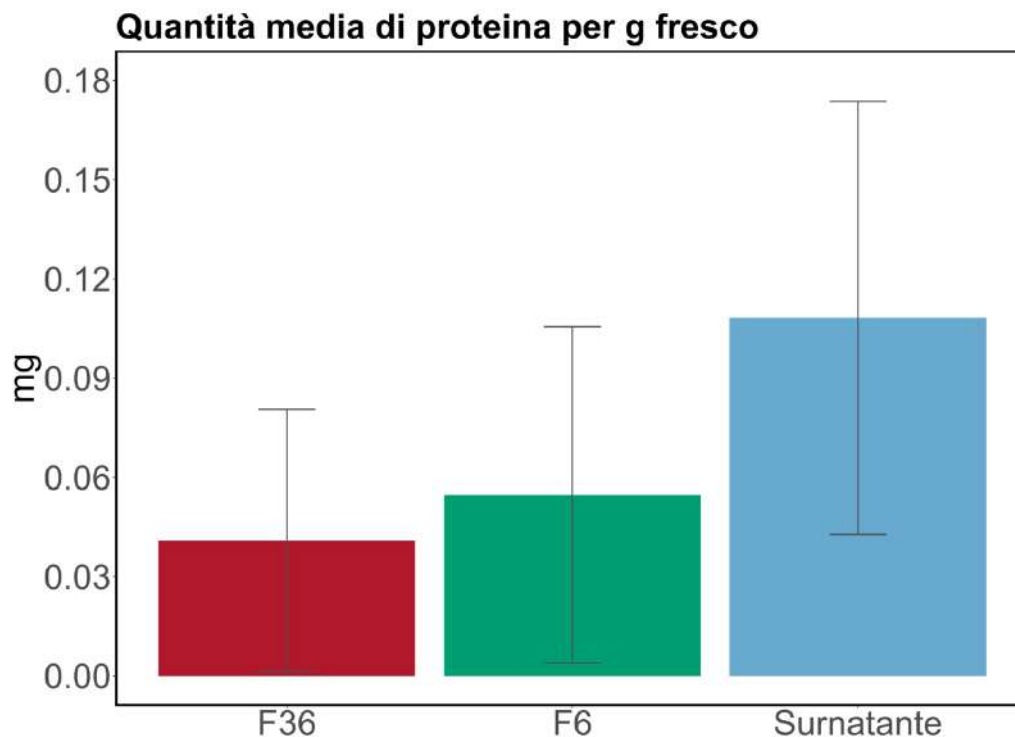
**Fig. 14:** immagini delle cellule di caffè al microscopio a fluorescenza. A sinistra le cellule sono osservate nello spettro del visibile. A destra invece sono osservate sfruttando la fluorescenza che l'FDA conferisce alle cellule vitali.



**Fig. 15:** Rappresentazione della progressiva variazione di vitalità cellulare

### 4.3 Quantificazione proteica

Grazie ai dati ottenuti dal saggio di Bradford è stato possibile stimare la quantità media di proteina presente nella F36, nella F6 e nel surnatante per grammo di peso fresco (Fig. 16). Nonostante l'ampia variabilità dei dati, possiamo osservare che la quantità di proteina presente nelle frazioni F36 e F6 è simile mentre nel surnatante la quantità media di proteina è di circa il doppio. Questo indica che nel surnatante, poiché le frazioni sono state ricavate utilizzando un filtrato cellulare come materiale di partenza, sono presenti una grande quantità di proteine solubili che concorrono alla proteina totale.



**Fig. 16:** Rappresentazione della quantità media di proteina in F36, F6 e nel surnatante per grammo di peso fresco



#### 4.4 Dimensioni delle particelle e potenziale Zeta

I dati ottenuti dal saggio di diffusione dinamica della luce (DLS) sono stati utilizzati per determinare le dimensioni delle particelle presenti nelle diverse frazioni. Come illustrato dalla Fig. 17, è presente una grande variabilità che ha evidenziato come la dimensione media delle vescicole ottenute dalla frazione F6 sia comunque inferiore alle dimensioni medie ottenute dalla frazione F36. L'alta variabilità dei dati ricavati dalla frazione F36 è ipotizzabile derivi dalla mancanza di un sistema standardizzato di produzione di cellule mediante sospensione cellulare per il caffè. Nonostante ciò, nella frazione F6 si osservano valori più costanti, che stanno in un range che va dai 20 nm ai 70 nm circa. Si osserva inoltre che, nonostante l'ampia variabilità, il rapporto tra il valore delle dimensioni della frazione F36 e F6 espresso in percentuale sta in un range che va dal 23% al 35%.

Il potenziale  $\zeta$  rilevato varia in un range che va da -0,7 a 1,7 mV. Questi valori sono molto vicini allo zero e suggeriscono la possibilità che parte della variabilità dei dati sia dovuta all'aggregazione di queste particelle.

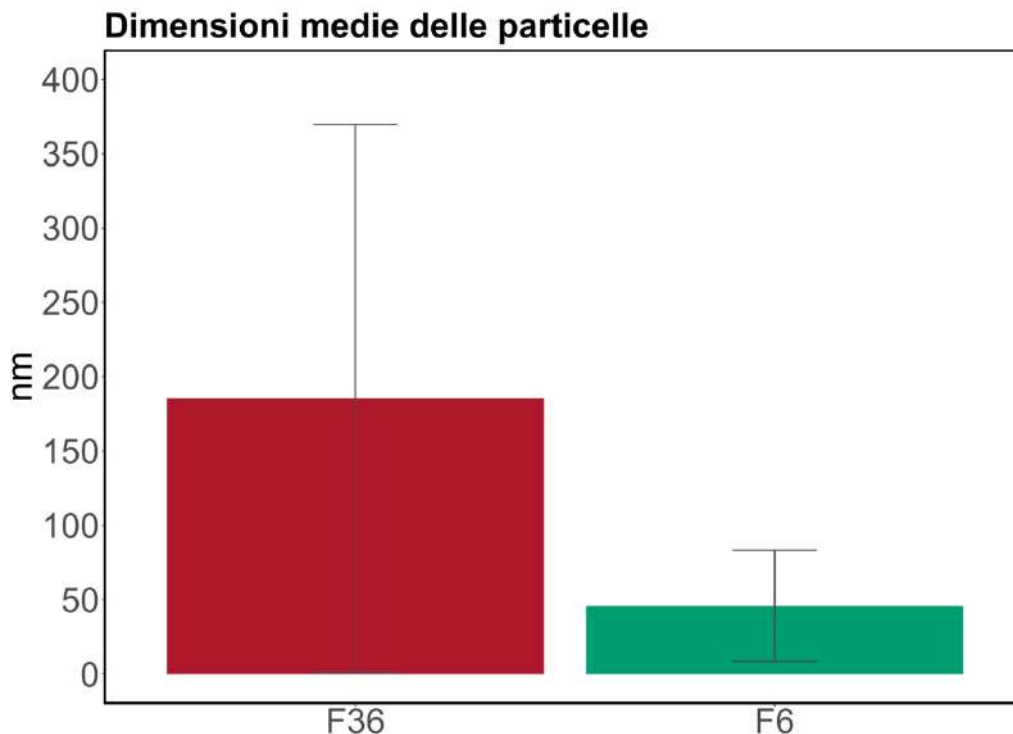
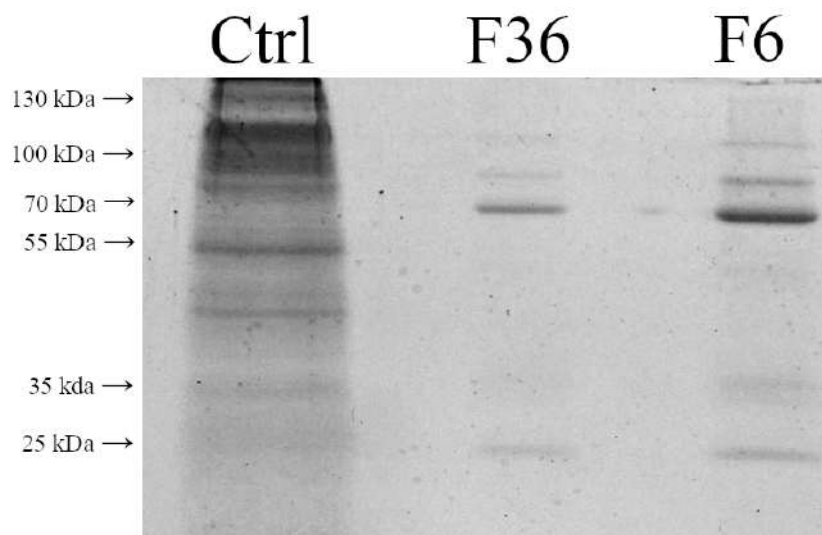


Fig. 17: Dimensioni medie delle particelle rilevate nelle frazioni F36 e F6

## 4.5 Separazione elettroforetica delle proteine

La tecnica di elettroforesi verticale su gel di poliacrilammide (SDS PAGE) ha permesso una caratterizzazione proteica preliminare determinata dalla separazione delle proteine. In tutti i campioni sono presenti delle bande più scure che indicano la presenza di proteine con pesi molecolari differenti, determinati dagli standard molecolari.

Analizzando le corse elettroforetiche dall'alto verso il basso (Fig. 18), si osserva che nella corsia caricata con il controllo formato dalle cellule è presente una grande concentrazione proteica tra i 130 e i 100 kDa non determinata da bande proteiche ben definite ma continue, sono poi presenti 2 bande proteiche con un peso di circa 55 kDa e 40 kDa e infine sono presenti 2 ultime bande più lievi con un peso di circa 35 kDa e 25kDa. Nelle rimanenti corsie F36 e F6 si osserva che le bande proteiche si trovano nelle stesse posizioni ma sono più evidenti nella corsia F6, in particolare si osservano due bande lievi a 130 kDa e a 100 kDa, una banda molto evidente a circa 70 kDa, una banda lieve e meno definita attorno ai 35 kDa e infine una banda lieve tra i 25 e i 15 kDa.

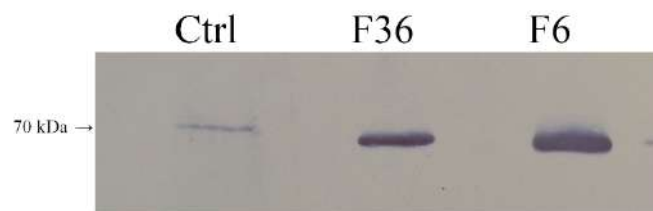


**Fig. 18:** Risultato della corsa elettroforetica

## 4.6 Immunodeterminazione di alcuni marcatori di membrana

Utilizzando il Western blot è stato possibile caratterizzare alcune componenti legate alla membrana di queste vescicole.

Osservando la reazione ottenuta utilizzando l'anticorpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma (Fig.19) si nota che in tutti i campioni è presente una banda attorno ai 70 kDa. Nel controllo la banda ha poca intensità, mentre sia in F36 e in F6 le bande presenti sono molto ben visibili, anche se F36 è leggermente più debole di F6.



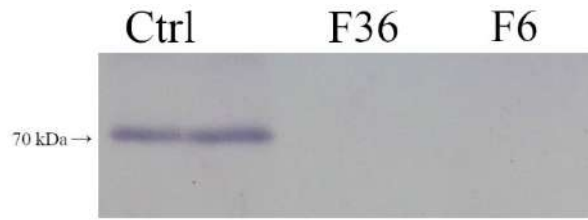
**Fig. 19:** Reazione ottenuta con l'anticorpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma

Nella reazione ottenuta con l'anticorpo anti-V-ATPasi (Fig. 20) si osserva che nel controllo è presente una banda poco intensa attorno ai 30 kDa mentre nelle frazioni F36 e F6 non sono evidenti bande significative.



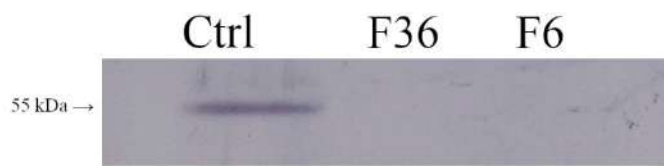
**Fig. 20:** Reazione ottenuta con l'anticorpo anti-V-ATPasi

La reazione ottenuta con l'anticorpo anti-CNX1/2 (Fig. 21) mostra una banda molto intensa solamente nel controllo, a circa 70 kDa, mentre nelle frazioni F36 e F6 non sono presenti bande significative.



**Fig. 21:** Reazione ottenuta con l'anticorpo anti-CNX1/2

Infine, la reazione ottenuta con l'anticorpo anti-Sec21p (Fig. 22) mostra una banda nel Controllo a circa 55 kDa. Sia in F36 che in F6 non sono evidenti bande proteiche.



**Fig. 22:** Reazione ottenuta con l'anticorpo anti-Sec21p

Dai risultati ottenuti con l'immunoblotting possiamo affermare che la composizione della membrana di queste vescicole derivi prevalentemente da plasmalemma. In particolare, è ipotizzabile che queste vescicole derivino da estroflessioni del plasmalemma da parte delle cellule in coltura liquida, verso il mezzo che le circonda.

Inoltre, questi risultati suggeriscono che le colture cellulari non rilasciano nel mezzo frazioni di endomembrane (tonoplasto, Golgi o reticolo endoplasmico). L'assenza di *cross-reactivity* degli anticorpi specifici contro queste frazioni conferma la ridotta presenza nel mezzo di coltura di contaminazioni da membrane microsomiali che possono essere liberate da processi di lisi cellulare.

## 5. CONCLUSIONI

Grazie all'incremento degli studi sulle le funzioni fisiologiche e patologiche su organismi e sulle applicazioni tecnologiche degli esosomi di origine vegetale, si è incominciato a comprendere l'enorme potenziale di queste vescicole. Ad oggi, tuttavia, mancano ancora protocolli di estrazione standardizzati che permettano di ottenere l'isolamento di esosomi da colture cellulari in mezzo liquido in maniera ripetibile e costante.

In questo lavoro di tesi sono stati isolati e caratterizzati esosomi derivanti da colture cellulari di caffè in mezzo liquido. In particolare, le prove di caratterizzazione sono state effettuate utilizzando come campioni le due diverse frazioni F36 e F6 ottenute durante la fase di isolamento.

I risultati ottenuti dagli esperimenti per la determinazione delle dimensioni delle particelle hanno dimostrato che le vescicole presenti nella frazione F6 hanno dimensioni che stanno in un range che va dai 20 nm ai 70 nm, un range di valori che suggerisce che potrebbero, in effetti, trattarsi di esosomi. In F36 invece, oltre ad essere molto eterogenee, le dimensioni medie rilevate sono dal 65 % al 75 % maggiori rispetto alla F6, dovuto probabilmente alla precipitazione di componenti grossolane ancora presenti in soluzione o all'aggregazione di più vescicole fra loro.

I risultati ottenuti dalle diverse prove di immunoblotting non solo hanno dimostrato che la composizione della membrana di queste vescicole derivi prevalentemente di plasmalemma, ma ha anche dimostrato l'assenza di contaminazione da endomembrane (ER e Golgi), che possono essere rilasciate dalle cellule nel mezzo di coltura, e da membrane microsomiali, indicatori di lisi cellulare.

In questo studio, gli esosomi di caffè sono stati isolati e caratterizzati per quanto riguarda le dimensioni e l'origine della membrana da cui si formano. Tuttavia, per comprendere ulteriormente le caratteristiche di queste vescicole sono richiesti altri studi; ad esempio, immagini al microscopio elettronico e la caratterizzazione completa delle componenti proteiche e fosfolipidiche di membrana permetterebbero una conoscenza più approfondita di queste strutture. Inoltre, è di grande interesse identificare con precisione il contenuto di queste vescicole attraverso un sequenziamento del loro contenuto in DNA e RNA e una caratterizzazione completa dei metaboliti secondari potenzialmente inclusi.

Dopo aver stabilito con precisione la natura di queste vescicole, e dopo aver trovato una metodologia ben definita per la produzione di esosomi di dimensioni costanti, potranno essere indagate le modalità di caricamento e di trasporto di sostanze bioattive più adatte al loro utilizzo come vettori. In particolare, uno studio di Antoine et al. del 2023 ha dimostrato l'efficacia dell'effetto del cafestolo, un diterpene presente in forma esterificata nei semi delle piante del

genere *Coffea*, come antifungino e insetticida. In questo studio il cafestolo ha dimostrato di riuscire a condizionare la crescita del micelio di 5 su 6 dei funghi patogeni testati e ha ridotto in maniera significativa la quantità di larve, pupe e adulti di due specie di moscerini della frutta.

Se inseriti in questo contesto, gli esosomi di caffè, in quanto vettori naturali di metaboliti secondari, in futuro potrebbero essere utilizzati nella loro forma nativa come trattamento antifungino e insetticida biocompatibile e a degradabilità completa. Inoltre, l'attività naturale di queste vescicole potrebbe essere coadiuvata o regolata dall'effetto delle sostanze bioattive caricate al loro interno.

In conclusione, i risultati delle prove effettuate hanno dimostrato come la metodologia di isolamento utilizzata per ottenere esosomi da colture cellulari di caffè si sia rivelata efficace, relativamente semplice da un punto di vista operativo, e potenzialmente non aggressiva nei confronti delle cellule di diversi organismi.

## BIBLIOGRAFIA

Pin Li, Melisa Kaslan, Sze Han Lee, Justin Yao, and Zhiqiang Gao Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 2017; 7(3): 789–804

De Palma M, Ambrosone A, Leone A, Del Gaudio P, Ruocco M, Turiák L, Bokka R, Fiume I, Tucci M, Pocsfalvi G. Plant Roots Release Small Extracellular Vesicles with Antifungal Activity. *Plants*, 2020; 9(12):1777

Huang, Y., Wang, S., Cai, Q., and Jin, H. Effective methods for isolation and purification of extracellular vesicles from plants. *J. Integr. Plant Biol*, 202; 63: 2020–2030

Jisu Kim, Shiyi Li Shuya Zhang, Jianxin Wang Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. *Asian J Pharm Sci*, 2022 ;17(1): 53-69

Jae Young You, Su Jin Kang, Won Jong Rhee Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive Materials* 6 2021; 4321–4332

ChristinaSchuh, Jimena Cuenca, Francisca Alcayaga Miranda, Maroun Khoury Exosomes on the border of species and kingdom intercommunication. *Translational Research*, 2019; 210 80-98

Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CSF, Wiegmans AP, Leimgruber A, Möller A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J. Extracell. Vesicles*, 2015; 4: 27031

Brian D. Rutter and Roger W. Innes Extracellular Vesicles Isolated from the Leaf Apoplast Carry Stress-Response Proteins. *Plant Physiology*, 2017; 173: 728–741

Liégeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 2006; 173: 949–961

Beckett K, Monier S, Palmer L, Alexandre C, Green H, Bonneil E, Raposo G, Thibault P, Le Borgne R, Vincent JP Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes. *Traffic*, 2013; 14: 82–9

Corrigan L, Redhai S, Leiblich A, Fan SJ, Perera SM, Patel R, Gandy C, Wainwright SM, Morris JF, Hamdy F, et al. BMP-regulated exosomes from Drosophila male reproductive glands reprogram female behavior. *J Cell Biol*, 2014; 206: 671–688

Urzì O, Raimondo S, Alessandro R Extracellular Vesicles from Plants: Current Knowledge and Open Questions. *Int. J. Mol. Sci*, 2021; 22: 5366

An Q, van Bel AJ, Huckelhoven R Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? *Plant Signal*, 2007; 2: 4–7

Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin FM., Palmquist J, Huang SD, Jin H Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 2018; 1126–1129

Roth R, Hillmer S, Funaya C, Chiapello M, Schumacher K, Lo Presti L, Kahmann R, Paszkowski U Arbuscular cell invasion coincides with extracellular vesicles and membrane tubules. *Nat. Plants* , 2019; 204–211

Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J, Schweizer P HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* 22, 2010; 3130–3141

Haseeb Anwar Dad, Ting-Wei Gu, Ao-Qing Zhu, Lu-Qi Huang, and Li-Hua Peng Plant Exosome-like Nanovesicles: Emerging Therapeutics and Drug Delivery Nanoplatfoms. *Mol Ther*, 2021; 29(1): 13-31

Karamanidou T, Tsouknidas A Plant-Derived Extracellular Vesicles as Therapeutic Nanocarriers. *Int J Mol Sci*, 2022; 23: 191



Singh RP, Handa R, Manchanda G Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. *Journal of Controlled Release*, 2021; 329: 1234-1248

Reyes IV, Nunez EV, Saldivar RHL, Arguello BM Effects of Nanoparticles on Germination, Growth and Plant Crop Development. *Agricultural Nanobiotechnology*, 2018; pp. 77-110

Ramírez RG, Luqueño FF, Pérez GM, Hernández HP, Valdez FL, Núñez EV, Serna SL, Herrera GS, Cortés AZ Inchauregi VU Agronobiotechnologies to Improve the Water Quality in Irrigation Systems. *Agricultural Nanobiotechnology*, 2018; pp. 141-157

Qiao L, Sánchez JN, Hamby R, Capriotti L, Chen A, Mezzetti B, Jin H Artificial nanovesicles for dsRNA delivery in spray-induced gene silencing for crop protection. *Plant Biotechnol J*, 2023; 21(4): 854-865

Kantarcıoğlu M, Yıldırım G, Akpınar Oktar P, et al. Coffee-derived exosome-like nanoparticles: Are they thesecret heroes? *Turk J Gastroenterol*, 2022

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007; 9(6): 654-659

Chuang YH, Quach A, Absher D, Assimes T, Horvath S, Ritz B Coffee consumption is associated with DNA methylation levels of human blood. *Eur J Hum Genet*, 2017; 25(5): 608-616

Bosch S. et al. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci Rep* 6, 2016; 36162

Antoine G, Vaissayre V, Meile JC, Payet J, Conejero G, Costet L, Bastide IF, Joet T, Dussert S Diterpenes of *Coffea* seeds show antifungal and anti-insect activities and are transferred from the endosperm to the seedling after germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023; 194: 627–637