



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

---

DI4A - DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGROALIMENTARI,  
AMBIENTALI E ANIMALI

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Molecolari  
(LM-9)

## **Culture cellulari di caffè per la produzione di esosomi**

RELATORE:  
Prof. Marco Zancani

LAUREANDO:  
Luca De Bortoli

CORRELATRICE:  
Dott.ssa Dora Scarpin

---

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

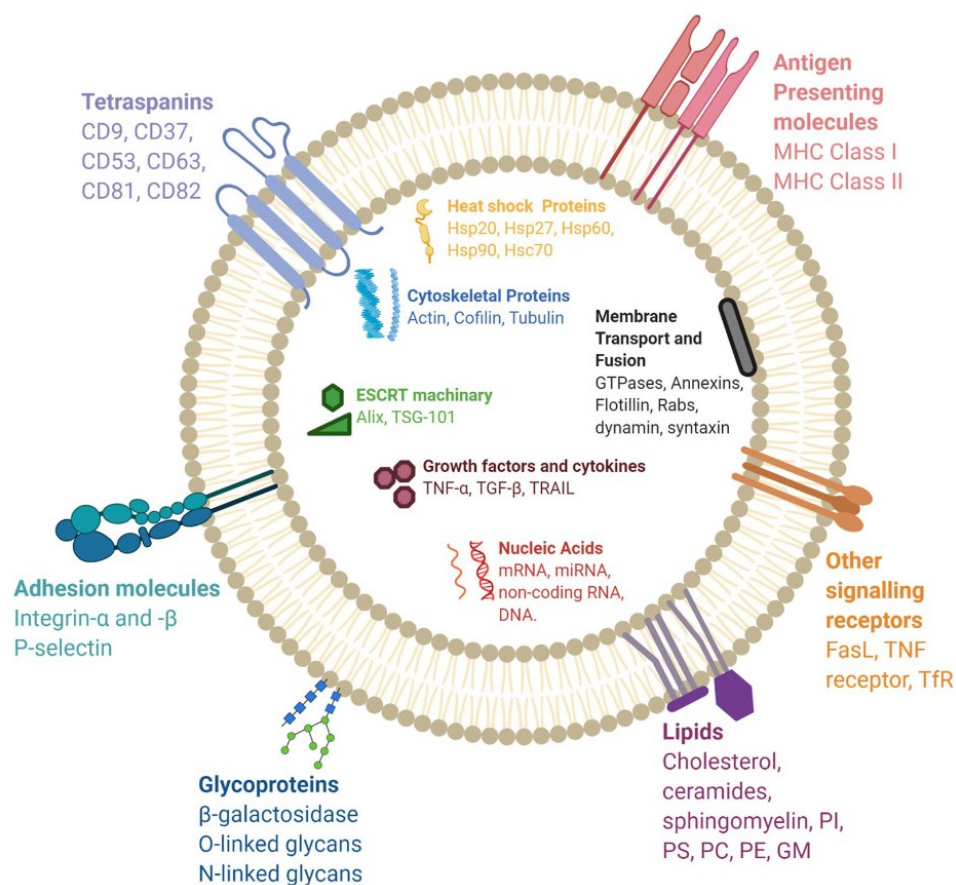
# Indice

<b>Introduzione</b> .....	<b>3</b>
Esosomi: caratteristiche, origine e funzioni.....	3
Esosomi in diagnosi e terapia .....	6
Esosomi di origine vegetale .....	8
Caffè: proprietà terapeutiche e metaboliti.....	13
Colture cellulari .....	16
Sospensioni cellulari .....	18
<b>Scopo della tesi</b> .....	<b>21</b>
<b>Materiali e Metodi</b> .....	<b>22</b>
Materiale vegetale di partenza.....	22
Colture cellulari .....	22
Callogenesi.....	24
Sospensioni cellulari .....	24
Curva di crescita.....	25
Conta cellulare.....	26
Isolamento degli esosomi.....	26
Quantificazione del contenuto proteico .....	29
Determinazione delle dimensioni delle particelle e potenziale Zeta .....	30
Elettroforesi .....	31
Western blot .....	33
<b>Risultati e discussione</b> .....	<b>36</b>
Curve di crescita .....	36
Vitalità cellulare .....	37
Saggio di Bradford .....	38
Dimensioni delle particelle e potenziale Zeta .....	39
Elettroforesi .....	40
Western blot .....	41
<b>Conclusioni</b> .....	<b>44</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>46</b>
<b>Sitografia (consultata al 14/11/23)</b> .....	<b>61</b>



maturazione, vescicole intralume (ILV) da gemmazione interna, fino a diventare endosomi tardivi o corpi multivescicolari (MVB) dotati di molti ILV. Da qui i MVB possono o fondersi con i lisosomi verso la via di degradazione o fondersi con la membrana plasmatica rilasciando gli ILV come esosomi (Zhang *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2018a).

Queste vescicole contengono diversi lipidi e proteine derivanti dalla cellula da cui nascono, alcuni comuni per tutti gli esosomi, altri specifici per il tipo cellulare d'origine (Zhang *et al.*, 2019; Gaglani *et al.*, 2011) (Figura 2).



**Figura 2:** Composizione degli esosomi (Gurung *et al.*, 2021).

La componente del *bilayer*, per quanto riguarda gli esosomi di mammifero, è ricca di alcuni lipidi associati alle zattere lipidiche, come colesterolo e ceramidi (il quale permette di differenziare gli esosomi dai lisosomi), oltre a sfingolipidi (come la sfingomielinina) e fosfogliceridi (come la fosfatidilserina). Inoltre, queste vescicole presentano catene saccaridiche sulla loro superficie esterna, come mannosio,

polilattosammine, acido  $\alpha$ -2,6 salicilico e N-glicani (Vlassov *et al.*, 2012; Patil e Rhee, 2019; Kim *et al.*, 2022; Batista *et al.*, 2011).

Tra le proteine che caratterizzano gli esosomi di mammifero ci sono le proteine *heat shock* (HSP70 e HSP90) coinvolte nel *binding* e nella presentazione di antigene durante stress cellulare. Sono state riscontrate anche proteine legate al rilascio di esosomi come Alix e TSG101, oltre che proteine coinvolte nel trasporto e fusione di membrana (come le anessine e le proteine della famiglia RAB). Gli esosomi presentano anche tetraspanine come CD9, CD63, CD81 e CD82 coinvolte in penetrazione, invasione e fusione cellulare. CD63 e CD81 sono stati riscontrati essere marcatori per l'isolamento di queste vescicole, assieme anche a TSG101 e HSP70 (Zhang *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2023; Choi *et al.*, 2015).

Oltre alle proteine e lipidi, gli esosomi trasportano anche acidi nucleici come DNA, mRNA e *noncoding RNA* (Xie *et al.*, 2022). Gli esosomi possono proteggere il loro contenuto dall'azione di enzimi idrolitici grazie alla presenza della loro membrana (Record, 2013).

Originariamente si pensava che gli esosomi fossero coinvolti nell'omeostasi cellulare attraverso l'eliminazione di scarti cellulari (Nagarajah, 2016; Zhang *et al.*, 2019), ma si sono rivelati essere funzionali veicoli per il trasporto di lipidi, proteine e acidi nucleici capaci di influenzare cellule bersaglio a distanza (Zhang *et al.*, 2019). Tradizionalmente, le cellule vicine comunicano tra di loro attraverso contatti diretti come ad esempio le *gap junctions*, oppure via interazioni proteiche, mentre per comunicazioni a distanza sfruttano fattori solubili come le citochine, ormoni oppure segnali elettrici (Zhang *et al.*, 2019), ma queste vescicole paiono avere ruolo in comunicazione cellulare (Zhang *et al.*, 2019), sia a corta che lunga distanza. Infatti, sono stati riscontrate in diversi fluidi corporei come sangue, urina e latte materno (Borges *et al.*, 2013).

Gli esosomi possono interagire con le loro cellule target attraverso diversi meccanismi quali interazioni ligando-recettore, fusione diretta con la membrana o

internalizzazione attraverso endocitosi. In questo modo le molecole trasportate influenzano il comportamento e fenotipo delle cellule in diversi modi come il trasferimento di recettori attivati, la stimolazione delle cellule via ligandi presenti sulla superficie delle vescicole, oppure attraverso la riprogrammazione epigenetica (Zhang *et al.*, 2019).

Oltre alla comunicazione cellulare, lo studio degli esosomi ha rivelato il loro ruolo in diversi processi fisiologici. Ad esempio, queste vescicole partecipano nelle risposte del sistema immunitario, in cui sembrano essere in grado di trasferire antigeni a cellule dendritiche per l'attivazione di cellule T CD8+ e CD4+ (Morelli *et al.*, 2004). Diversi studi suggeriscono il loro coinvolgimento nei processi di infiammazione (Chan *et al.*, 2019) oltre che nella riproduzione e fertilità con azione protettiva post-natale attraverso l'assunzione del latte materno (Kalluri e LeBleu, 2020).

## **Esosomi in diagnosi e terapia**

Gli esosomi hanno anche ruolo in patologie, sono stati osservati promuovere la creazione di ambienti favorevoli alla crescita tumorale inducendo, ad esempio, angiogenesi, aiutando la sopravvivenza alla risposta immunitaria e agevolando metastasi (Nagarajah, 2016). Gli esosomi partecipano anche in malattie neurodegenerative attraverso il trasporto di proteine *missfoldate* a neuroni sani (Ghidoni *et al.*, 2008), oltre che essere coinvolte in infezioni virali trasportando virus da una cellula all'altra (Vlassov *et al.*, 2012).

Gli esosomi svolgono quindi un ruolo significativo sia in condizioni fisiologiche che in alcune patologie. Questo li rende un oggetto di grande interesse per gli studi diagnostici (Ha *et al.*, 2016). Presentano marcatori specifici che riflettono il tipo di cellula da cui provengono e il loro contenuto ne rispecchia lo stato fisiologico, fornendo dei potenziali biomarcatori di stati patologici (Zhang *et al.*, 2019; Kanninen *et al.*,

2016). La loro membrana protegge il contenuto dall'azione di enzimi degradativi e gli esosomi rimangono stabili in conservazione per molto tempo (Record, 2013; Kanninen *et al.*, 2016). Queste vescicole possono essere isolate da diversi fluidi corporei che, assieme al fatto che oltrepassano la barriera ematoencefalica, li rende strumenti utili per diagnosi precoci non invasive, importanti, ad esempio, in patologie cerebrali (Kanninen *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2020). Diversi studi hanno mostrato il potenziale dei biomarcatori estratti da esosomi presenti in circolo, ma anche nella saliva, come diagnosi per il Parkinson (Younas *et al.*, 2022).

Queste vescicole possono essere anche importanti strumenti di diagnosi per la presenza di tumori (Soung *et al.*, 2017), ma anche per analisi prenatali per diverse complicanze legate alla gravidanza (Yang *et al.*, 2020), o diagnosi di patologie, legate a malattie del pancreas o metaboliche come il diabete (Han *et al.*, 2022).

Gli esosomi sono diventati oggetto di studio anche per il loro utilizzo in terapia. Queste vescicole hanno un'intrinseca capacità di trasporto tessuto-specifica, una lunga permanenza in circolo e la capacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica, oltre al fatto che la loro superficie e contenuto possono essere funzionalizzati con molecole, proteine, acidi nucleici non nativi. Queste caratteristiche rendono gli esosomi potenziali strumenti per il trasporto di farmaci (Ha *et al.*, 2016; Zeng *et al.*, 2023). Gli esosomi possono essere utilizzati per il trattamento di tumori: ad esempio, nello studio di Yang e colleghi (2015), è stata riportata la capacità degli esosomi nel trasporto di farmaci antitumorali attraverso la barriera ematoencefalica e la loro azione terapeutica citotossica in vivo in modelli animale. Diversi studi hanno riscontrato l'utilità degli esosomi nel trattare patologie infiammatorie (Wang *et al.*, 2023), oltre che nella rigenerazione di ferite, nell'angiogenesi (Lv *et al.*, 2022) e nel trattamento di malattie neurodegenerative (Cano *et al.*, 2023).

## Esosomi di origine vegetale

Un problema dell'applicazione dei esosomi in alcune terapie consiste nelle alte quantità necessarie per l'utilizzo sull'uomo. Il numero di esosomi prodotti da cellule di mammifero in coltura è limitata e la produzione su ampia scala implica problemi di costi e lunghi tempi di lavorazione (You *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). A ciò si aggiunge il fatto che la loro coltura richiede l'utilizzo di componenti come il siero fetale bovino (FBS), che impedisce l'approvazione come farmaco per problemi di sicurezza (You *et al.*, 2021). Inoltre, le cellule utilizzate per la produzione di esosomi sono spesso linee di cellule rese immortali (come ad esempio cellule tumorali), fatto che crea un potenziale rischio che le vescicole ospitino sostanze carcinogene (Wang *et al.*, 2021), senza contare i problemi etici dell'utilizzo di esosomi di origine umana (Sarasati *et al.*, 2023). Per questi motivi, diversi studi hanno iniziato a valutare gli esosomi derivanti da piante come una possibile alternativa (You *et al.*, 2021).

Gli esosomi di origine vegetale hanno proprietà strutturali simili a quelli di mammifero (Kim *et al.*, 2022), ma rispetto ad essi presentano diversi vantaggi. Essi sono generalmente più sicuri, dato che le piante non ospitano patogeni umani o agenti zoonotici, sono tollerati dal sistema immunitario, dato che sono presenti negli alimenti, ed hanno alta stabilità nel tratto gastro intestinale. Inoltre, offrono una fonte meno costosa, scalabile e sostenibile, dato che possono essere isolati da numerosi vegetali (Wang *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2022; Subha *et al.*, 2023).

Gli esosomi di origine vegetale possono essere isolati da succhi, da omogenati di vari tessuti della pianta, oltre che da fluidi apoplastici, essudati liquidi o dal terreno della coltura cellulare (Subha *et al.*, 2023; Farley *et al.*, 2022). I metodi di estrazione di queste vescicole seguono i metodi ideati per l'estrazione dei esosomi di mammifero (Suharta *et al.*, 2021). Esistono diverse tecniche di estrazione degli esosomi che si basano sulle caratteristiche di queste vescicole come le dimensioni, morfologia o la presenza di marcatori sulla loro superficie (Subha *et al.*, 2023).



Tra queste tecniche, la purificazione attraverso l'ultracentrifugazione è la più usata. Questa tecnica sfrutta una serie di centrifugazioni a velocità crescente che separano, in base diverse dimensioni e densità, gli esosomi rispetto ad altre componenti cellulari. Seppure questa tecnica sia considerata ideale per l'estrazione di esosomi, la preparazione del materiale di partenza non è complessa ed è conveniente in termini di costo nel lungo termine, richiede però lunghi tempi di lavoro e un grosso investimento in termini di strumentazione e loro mantenimento, rendendone difficile l'applicazione in paesi o laboratori poveri di risorse (Subha *et al.*, 2023; Suharta *et al.*, 2021).

Esistono anche metodi di estrazione basati sulle dimensioni, quali l'ultrafiltrazione e la cromatografia ad esclusione molecolare. L'ultrafiltrazione separa la frazione esosomiale utilizzando filtri costituiti da nanomembrane, è adatta all'applicazione su larga scala, isola gli esosomi con alto grado di purificazione ed è più veloce dell'ultracentrifugazione. Però questa tecnica presenta il rischio di intasamento dei filtri e la pressione utilizzata durante il filtraggio può danneggiare le vescicole. Mentre, la cromatografia ad esclusione molecolare separa in modo passivo utilizzando la gravità e tende a conservare di più la struttura e la bioattività delle vescicole rispetto all'ultrafiltrazione, però presenta problemi di applicazione su larga scala.

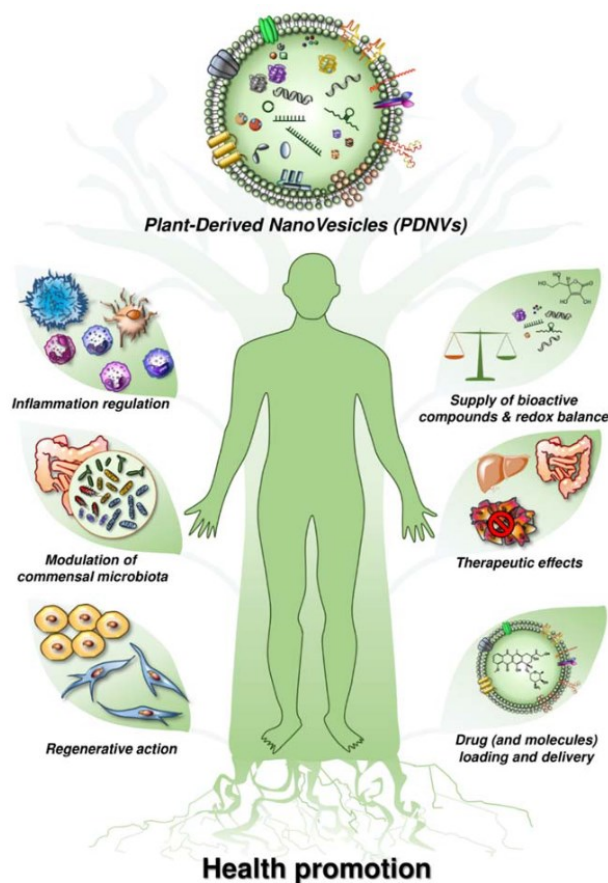
È possibile, inoltre, purificare gli esosomi attraverso la precipitazione, utilizzando polimeri altamente idrofilici come il glicole polietilenico, il quale interferisce con le molecole d'acqua attorno alle vescicole, creando un ambiente idrofobico che induce la loro precipitazione. Seppure questa tecnica presenti alte rese, la frazione esosomiale può contenere molte impurità.

Gli esosomi possono essere inoltre isolati via immunoaffinità, utilizzando matrici magnetiche derivatizzate con anticorpi che riconoscono i marcatori sulla superficie degli esosomi. Questo metodo però non è adatto ad un'applicazione su larga scala per la necessità di ottenere e derivatizzare gli anticorpi, inoltre la tecnica necessita

di marcatori unici per queste vescicole, che al momento non sono stati ancora ben caratterizzati, soprattutto per le piante (Subha *et al.*, 2023; Suharta *et al.*, 2021).

Gli esosomi sono interessanti anche per il loro ruolo nelle difese delle piante. Le interazioni pianta-patogeno, attraverso le loro rispettive vescicole, aumentando la resistenza o rendendo più suscettibili le specie vegetali all'azione di agenti quali virus, batteri e funghi. Studiare il ruolo degli esosomi in queste relazioni è importante per agevolare lo sviluppo e miglioramento di tecniche per un'agricoltura più sostenibile (Liu *et al.*, 2021; Hansen e Nielsen, 2017; Zhou *et al.*, 2022).

Oltre a questo, gli esosomi di origine vegetale hanno assunto particolare interesse anche grazie alle loro intrinseche capacità terapeutiche, mostrando attività antiossidanti, antiinfiammatorie, antitumorali, antimicrobiche e di rigenerazione (Figura 3).



**Figura 3:** Potenzialità benefiche degli esosomi derivanti dalle piante, nell'immagine indicati come PDNVs (Logozzi *et al.*, 2022).

Nello studio di Ju e colleghi (2013), gli esosomi, isolati dall'uva, sono stati somministrati oralmente a modelli murini, osservando la loro azione nel promuovere il rinnovo dell'epitelio intestinale inducendo la proliferazione di cellule staminali nel tessuto, offrendo protezione contro le coliti. Esosomi isolati da cavolo e cavolo rosso hanno dimostrato attività antiinfiammatorie e di inibizione dell'apoptosi in vitro su cellule umane e murine (You *et al.*, 2021). Nel lavoro di Zhao e colleghi (2022), gli esosomi isolati da mirtillo presentavano capacità antiossidanti ed epatoprotettive. In modelli in vitro, utilizzando cellule HepG2 (cellule di epatoblastoma umano), questi esosomi riducevano significativamente le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e riducevano apoptosi. In modelli murini alimentati con dieta ad alto consumo di grassi, gli esosomi, somministrati in modo intragastrico, attenuano la disfunzione del fegato, riducendo il numero di gocce lipidiche nell'organo, migliorando la insulino-resistenza, suggerendo l'uso di queste vescicole per il trattamento della steatosi epatica non alcolica. Gli esosomi isolati da zenzero sono stati riscontrati essere selettivamente assorbiti dal batterio *Porphyromonas gingivalis*, patogeno coinvolto nella parodontite cronica, riducendone crescita e patogenicità in vitro e, in modelli murini, compromettendo la capacità del patogeno di attaccarsi e invadere le cellule epiteliali orali (Sundaram *et al.*, 2019). Nello studio in vitro di Kim e collaboratori (2021), è stato osservato come esosomi isolati da bucce di aloe vera venissero internalizzati in modo significativo in cheratinociti umani, attivando difese antiossidanti e prevenendo danno ossidativo in queste cellule. Utilizzando uno *scratch assay* è stato inoltre riscontrato come queste vescicole promuovono la migrazione di cheratinociti e fibroblasti nel sito di danno, mostrando il potenziale di queste vescicole nella rigenerazione della pelle. Proprietà antitumorali sono state riscontrate in vescicole isolate da pompelmo utilizzando esperimenti in vitro con cellule umane ottenute da melanoma (Stanly *et al.*, 2020).

Queste capacità terapeutiche, assieme al fatto che diversi studi hanno confermato l'assorbimento di queste vescicole vegetali da parte di cellule umane, rendono gli esosomi di origine vegetale degli allettanti strumenti per il trasporto di farmaci

nell'organismo (Orefice *et al.*, 2023). Diversi studi preclinici hanno dimostrato la possibilità di queste vescicole vegetali di essere caricate con molecole terapeutiche non native e trasportate nei siti di interesse. Ad esempio, studio di You e colleghi (2021), hanno mostrato come esosomi isolati da cavolo e cavolo rosso possano essere caricati con il farmaco chemioterapico antitumorale doxorubicina, osservando in test in vitro su linee cellulari umane di tumore del colon il trasporto del farmaco nelle cellule e la sua azione, riscontrando riduzione della vitalità cellulare maggiore rispetto l'uso del farmaco da solo.

Esosomi isolati da zenzero sono stati analizzati per il trasporto di siRNA per interferire con l'espressione della survivina, una proteina inibitrice dell'apoptosi e potenziale target per terapia antitumorale. L'azione delle vescicole è stata testata attraverso la somministrazione endovenosa in xenotrapianto sottocutaneo murino di cellule tumorali umane, osservando la riduzione della crescita tumorale e dell'espressione della survivina (Li *et al.*, 2018b). La somministrazione orale di esosomi isolati da pompelmo, in cui è stato inserito il farmaco antiinfiammatorio metotrexato (MTX), ha permesso di constatare il loro complessamento con macrofagi della lamina propria, inducendo una riduzione dei livelli di citochine proinfiammatorie. In modelli murini, questi esosomi riducevano gli effetti collaterali e la tossicità di MTX rispetto l'uso del farmaco libero nel trattamento delle coliti (Li *et al.*, 2023).

Le potenzialità di queste vescicole sono state recentemente verificate anche in diversi test clinici. È stata studiata l'assunzione orale di esosomi derivanti dall'uva per prevenire la mucosite orale che si verifica a seguito di radiazioni o chemioterapia per trattare tumori alla testa e al collo. L'utilizzo di queste vescicole è stato esteso per permettere il trasporto di curcumina per il trattamento di tumori al colon, oltre che per l'applicazione di esosomi derivanti da zenzero e aloe vera per trattare la sindrome dell'ovaio policistico (Orefice *et al.*, 2023; Mu *et al.*, 2023).

## Caffè: proprietà terapeutiche e metaboliti

Una pianta di particolare interesse per l'estrazione di esosomi è il caffè (*Coffea* spp.) (Figura 4). Il sottogenere *Coffea* include le specie coinvolte nella produzione di caffè, tra queste, *Coffea arabica* (caffè Arabica) e *Coffea canephora* (caffè Robusta) sono quelle principalmente utilizzate per scopi commerciali, con *C. arabica* utilizzata maggiormente (Al-Asmari *et al.*, 2020).



**Figura 4:** Pianta di *C. Arabica* (<https://antropocene.it/>)

Il caffè è una pianta perenne, l'arbusto può raggiungere fino ai 10 metri di altezza e produce come frutto una bacca rossa, detta anche "ciliegia", che contiene 2 semi (Hoseini *et al.*, 2021; Al-Asmari *et al.*, 2020). Dal seme tostato si ottiene una delle bevande più consumate ed apprezzate, ogni giorno circa 2.25 miliardi di tazze vengono ingerite in tutto il mondo (Surma e Oparil, 2021), con Brasile, Vietnam, Indonesia e Colombia i maggiori produttori di caffè (Hoseini *et al.*, 2021; Al-Asmari *et al.*, 2020).

Oltre agli effetti psicoattivi della caffeina per cui la bevanda è consumata (Segeritz e Vallier, 2017), diversi studi hanno riportato proprietà terapeutiche derivate dal consumo di caffè. C'è un grande interesse nell'isolamento di componenti naturali dalle piante per la scoperta di nuovi farmaci, e il caffè ha una ricca storia di proprietà mediche ora supportate da un numero crescente di studi scientifici (Al-Asmari *et al.*, 2020).

L'assunzione di caffè è stata associata a un ridotto rischio di sviluppo di fibrosi e cirrosi epatica (Liu *et al.*, 2015); inoltre, pare avere azione positiva nel prevenire patologie neurodegenerative come l'Alzheimer e il Parkinson (Wierzejska, 2017), oltre a malattie croniche come il diabete di tipo 2, patologie cardiovascolari e il cancro (Pietzner *et al.*, 2019). Queste proprietà non sono limitate alla bevanda ma anche a diverse parti della pianta come, ad esempio, le foglie, le quali sono state usate tradizionalmente per trattare diversi malesseri come diarrea, dolori intestinali, emicrania e febbre (Rosales-Villarreal *et al.*, 2019); inoltre, anche i fiori e i frutti sono dotati di attività terapeutiche (Al-Asmari *et al.*, 2020). Seppure si tenda ad associare tali effetti alla caffeina, risultati positivi sono stati osservati anche in caffè decaffeinato (Kantarcioğlu *et al.*, 2023), infatti *C. arabica* produce un'ampia gamma di metaboliti secondari aventi effetti positivi sulla salute umana (de Melo *et al.*, 2020).

Essendo organismi sessili, le piante interagiscono con diversi fattori potenzialmente dannosi di natura biotica o abiotica. Per fare fronte a questi stress le piante hanno evoluto un eterogeneo repertorio di prodotti chimici detti metaboliti secondari (Ncube e Van Staden, 2015). Sintetizzati generalmente in basse quantità da intermedi derivanti dal metabolismo energetico primario (fotosintesi, glicolisi, ciclo di Krebs, ecc.) (Ncube e Van Staden, 2015; Chandran *et al.*, 2020), i metaboliti secondari sono caratterizzati da alta diversità strutturale e funzionale (Ncube e Van Staden, 2015). Essi sono coinvolti in meccanismi di difesa contro patogeni e cambiamenti climatici, oltre che avere funzioni fisiologiche come attrarre impollinatori, regolare rapporti di simbiosi e fornire supporto strutturale attraverso la lignina. Ma la plasticità di questi prodotti bioattivi ha conferito alle piante, fin dall'antichità, un importante ruolo in ambito terapeutico dato i loro effetti farmacologici, oltre che usi in cosmesi, pigmenti, fragranze, o come supplementi alimentari (Ozyigit *et al.*, 2023; Chandran *et al.*, 2020; Bourgaud *et al.*, 2001; Ncube e Van Staden, 2015; Guerriero *et al.*, 2018).

Tra i metaboliti secondari prodotti nei semi di caffè si riscontrano principalmente composti fenolici quali gli acidi clorogenici, il cui membro più abbondante è l'acido 5-O-caffeoilchinico (5-CQA), che ha dimostrato di avere attività epato- e

cardioprotettive, antibatteriche e antivirali (Granados-Vallejo *et al.*, 2022). Altro metabolita abbondante è ovviamente la caffeina, appartenente alle metilxantine, assieme alla teobromina e la teofillina. I semi contengono anche diterpeni, come il cofestolo e il kaveolo, i quali presentano attività anticancerogena (Cavin *et al.*, 2002), oltre a metaboliti come triterpeni, flavonoidi (come catechine e antocianine) e la trigonellina (Al-Asmari *et al.*, 2020; Castro *et al.*, 2018; Gonzalez de Mejia e Ramirez-Mares, 2014), per cui è stata riscontrata attività ipoglicemica e neuroprotettiva in diversi studi in vivo (Ludwig *et al.*, 2014). Va notato però che la composizione di questi metaboliti può variare a seguito del processo di tostatura e preparazione della bevanda, influenzandone oltre che la loro disponibilità, anche le caratteristiche del caffè quali aroma, gusto e colore (Gonzalez de Mejia e Ramirez-Mares, 2014; Abdelwareth, 2021).

Tra i metaboliti prodotti a livello fogliare si riscontrano sempre metilxantine, diterpeni e acidi fenolici menzionati nel seme, assieme anche a flavonoidi, come la quercetina, kaempferolo e rutina (Al-Asmari *et al.*, 2020; Cangeloni *et al.*, 2022). Quest'ultima è stata osservata avere capacità antiossidante ed è usata come agente antifungino e antimicrobico (Gullon *et al.*, 2017).

Inoltre, a livello fogliare sono state isolati anche xantonoidi come la isomangiferina e la mangiferina (Al-Asmari *et al.*, 2020; Cangeloni *et al.*, 2022), la quale ha dimostrato diverse capacità farmaceutiche, antiinfiammatorie, neuroprotettive e antidiabetiche (Campa *et al.*, 2012).

Nonostante la numerosità elevata di ricerche, i meccanismi legati alle proprietà benefiche del caffè non sono ancora del tutto chiari. Si ipotizza che gli esosomi possano rappresentare uno strumento chiave per lo sviluppo e l'applicazione di queste attività terapeutiche (Kantarcioğlu *et al.*, 2023). La possibilità di ottenere queste vescicole da colture cellulari apre nuove prospettive in cui queste metodologie possono offrire un ottimo modello di studio.

## Colture cellulari

Le colture cellulari sono ottenute tramite tecniche atte alla crescita e proliferazione, in vitro, di cellule eucariote e procariote in condizioni controllate (Segeritz e Vallier, 2017). Le cellule, tessuti o organi vengono rimossi dall'organismo e posti su terreni di coltura contenenti nutrienti (come vitamine, amminoacidi, minerali, fattori di crescita e ormoni), ma anche componenti per controllare il pH e pressione osmotica, il tutto mantenuto in un incubatore per monitorare la temperatura e il livello di CO<sub>2</sub> (Aurora, 2013). Queste tecniche hanno permesso, negli anni, studi di biologia e fisiologia cellulare, l'analisi sull'azione e produzione di farmaci, e lo sviluppo di vaccini (Segeritz e Vallier, 2017; Lin *et al.*, 2019).

Un importante utilizzo delle colture cellulari è la crescita e la produzione di materiale vegetale. Le colture di cellule vegetali si basano sulla totipotenza di determinati tessuti vegetali, cioè la capacità di alcune cellule vegetali di riesprimere il loro potenziale genetico, subendo un processo di dedifferenziazione e potendo poi proliferare e ridifferenziare, rigenerando una pianta intera o un suo organo (Bhatia, 2015a; Ziv e Altman, 2003).

Le colture cellulari vegetali possono essere ottenute da qualsiasi parte della pianta (e.s., foglie, radici, fusti, semi, frutti) (Patra *et al.*, 2020), che prende il nome di espianto. Gli espianti vengono sterilizzati per eliminare possibili contaminazioni batteriche o fungine e posti su terreno di coltura solido, fornito di nutrienti e base minerale variabile. I più utilizzati sono ad esempio il terreno Murashige-Skoog, il B5 e l'N6, in cui si possono aggiungere regolatori di crescita per indurre le cellule a dedifferenziare a cellule meristematiche, formando una massa proliferante di cellule indifferenziate denominata callo (Patra *et al.*, 2020; Chandran *et al.*, 2020; Moscatiello *et al.*, 2013).

Il callo può essere propagato come tale o, utilizzando regolatori di crescita anche in diverse combinazioni, si può indurre la differenziazione in organi, come fusti e



radici, in un processo chiamato organogenesi. Il risultato finale potrebbe anche essere la rigenerazione di una pianta intera attraverso la formazione di un embrione apicale, che seguirà uno sviluppo simile a quello di un embrione zigotico, in un processo chiamato embriogenesi apicale (Bhatia, 2015a; Somers, 2014; Ziv e Altman, 2003; Kumar e Loh, 2012).

La crescita in vitro di cellule e tessuti di origine vegetale costituisce un importante strumento di ricerca, permettendo vari studi e applicazioni. Ad esempio, utilizzando la micropropagazione con tecniche di embriogenesi somatica, è possibile riprodurre specie di interesse o genotipi dotati di caratteristiche desiderabili, rigenerando piante geneticamente uniformi, potendo inoltre sanitizzarle da eventuali patogeni. Attraverso le colture cellulari è possibile indurre modificazioni genetiche attraverso la trasformazione delle cellule vegetali, oppure conservare il germoplasma, cioè l'informazione in vivo di tutti i geni presenti in una pianta, attraverso strategie come la criopreservazione delle cellule o dei tessuti (Bhatia, 2015a; Somers, 2014; Ziv e Altman, 2003; Kumar e Loh, 2012).

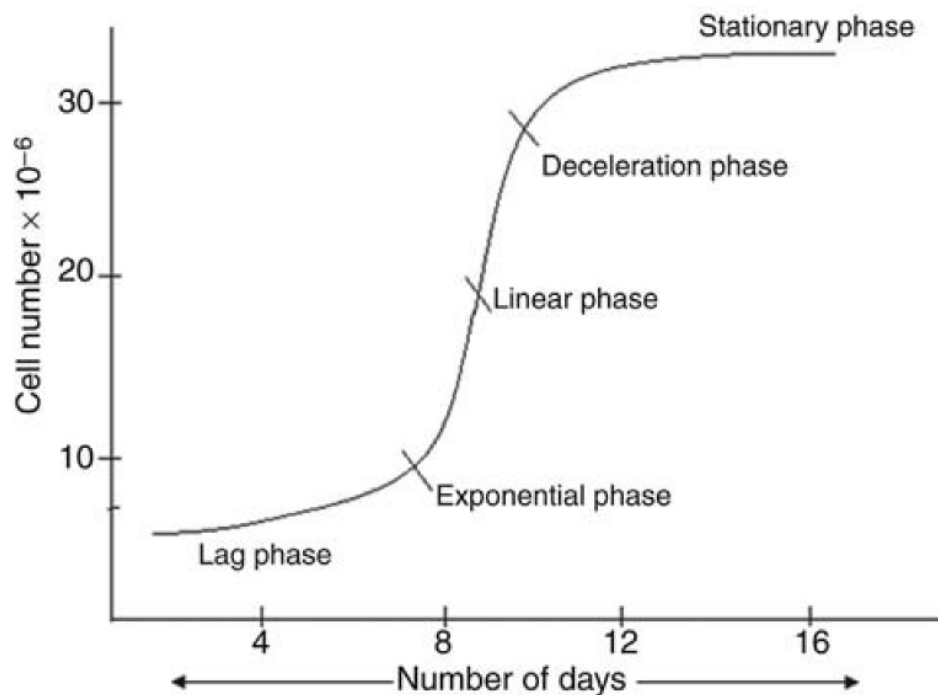
Queste tecniche in vitro ci permettono di studiare le potenzialità di queste fabbriche chimiche che chiamiamo piante. Permettendo, ad esempio, la produzione di metaboliti secondari in condizioni controllate, aumentandone la resa attraverso la selezione di linee cellulari, l'elicitazione, l'aggiunta di precursori della via metabolica d'interesse o con la manipolazione genica. In generale, queste tecniche ci permettono di studiare le funzioni di queste cellule in particolari tessuti o organi, ed esplorare le vie molecolari coinvolte in diversi processi metabolici delle piante. Tutto ciò sorpassando eventuali difficoltà legate alle interferenze indotte da patogeni o alla coltivazione in campo, riducendo inoltre le spese (Ozyigit *et al.*, 2023; Bourgaud *et al.*, 2001; Krasteva *et al.*, 2020; Moffat, 1995; Bhatia e Dahiya, 2015).

L'utilizzo di colture su terreno solido ha però diversi svantaggi. Oltre alle limitazioni nella crescita in certe direzioni, dovute al terreno di coltura e ai diversi tipi di contenitore, la crescita può essere alterata dalla disparità nello scambio di gas,

tossine di scarto e accesso ai nutrienti, senza parlare di fattori come gravità e variazioni all'esposizione alla luce, inducendo la polarizzazione nella crescita del callo. Queste limitazioni delle colture solide rendono le colture liquide preferibili, almeno per certe applicazioni (Ozyigit *et al.*, 2023).

## Sospensioni cellulari

Le colture liquide, denominate anche sospensioni cellulari, sono costituite da cellule cresciute in terreno liquido, comunemente stabilite partendo da calli derivanti, potenzialmente, da qualsiasi tipo di espianto. Il callo friabile viene aggiunto a un terreno di coltura liquido e il tutto viene mantenuto in agitazione, creando idealmente una sospensione di cellule singole, ma generalmente, a seconda della specie utilizzata, costituita da piccoli aggregati di 20-100 cellule.



**Figura 5:** Fasi della curva di crescita (Bhatia, 2015b).

La sospensione segue un prevedibile andamento di crescita che segue diverse fasi (Figura 5):

- Fase di lag: in questa fase si osserva minima crescita, poiché le cellule si adattano al nuovo terreno;
- Fase di log o fase esponenziale: caratterizzata da rapida crescita cellulare;
- Fase di crescita lineare: rapida crescita, finché non si osserva una graduale decelerazione all'esaurirsi di alcuni nutrienti;
- Fase stazionaria: il numero di cellule si stabilizza e la crescita si interrompe.

Al ridursi dei nutrienti si osserva senescenza e al prolungarsi di questa fase il numero di cellule inizia a diminuire. La coltura cellulare viene mantenuta attraverso regolari subculture, aggiungendo un'aliquota della sospensione e del terreno fresco (Bhatia, 2015b; Ozyigit *et al.*, 2023).

Rispetto alle colture solide, l'utilizzo di colture liquide è meno costoso, non richiedendo agente gelificante. Le sospensioni cellulari, rispetto ai calli, sono più adatte per le analisi sullo sviluppo e per studi biochimici, dato che riscontrano una maggiore proliferazione cellulare, come conseguenza del fatto che tutte le cellule, essendo immerse nel terreno e in agitazione, prevenendo aggregati, hanno pari possibilità di assorbire i vari nutrienti e altri componenti (Bhatia e Dahiya, 2015; Ascough e Fennell, 2004). Inoltre, se si utilizzano dei bioreattori, portando la coltura su larga scala, il terreno può essere cambiato in modo automatico, eliminando eventuali tossine, scarti cellulari e ricaricando i componenti del terreno, riducendo i costi e laboriosità derivanti dalle subculture (Ascough e Fennell, 2004).

Le sospensioni cellulari oltre a costituire un buon modello di studio delle vie biosintetiche cellulari (Shahzad *et al.*, 2017), hanno avuto uno svariato utilizzo per la sintesi di molti metaboliti: ad esempio diversi additivi alimentari (Krasteva *et al.*, 2020), metaboliti aventi interessanti proprietà terapeutiche come il stigmasterolo, per cui sono state riscontrate capacità antiinfiammatorie, antimicrobiche e antiossidanti (Rao *et al.*, 2022), oppure la catechina, che pare avere azioni antitumorali, anti epatite C e di prevenzione dell'obesità; inoltre in agricoltura può fungere da battericida e pesticida (Sutini *et al.*, 2020).

Le sospensioni cellulari possono inoltre fungere da importanti fonti per la produzione e lo studio delle vescicole extracellulari delle piante. L'impiego di colture cellulari in vitro ridurrebbe l'ammontare di sostanze isolate nel processo di estrazione rispetto l'utilizzo di tessuti vegetali. Inoltre, le condizioni di crescita in bioreattore possono essere ottimizzate per la specifica linea cellulare, migliorando le eventuali rese delle vescicole attraverso, ad esempio, l'elicitazione (Woith *et al.*, 2021).

Per questi motivi abbiamo deciso di utilizzare le sospensioni cellulari per lo studio degli esosomi rilasciati dalle cellule di caffè.

## **Scopo della tesi**

Questo lavoro si propone nel suo complesso di studiare le caratteristiche degli esosomi isolati da cellule di caffè. In particolare, sono state preparate sospensioni cellulari partendo da espianti fogliari di caffè. Da tali colture, possono essere isolati esosomi attraverso l'ausilio di ultracentrifugazioni, permettendone poi l'analisi di carica e dimensioni, assieme anche uno studio sulla provenienza cellulare di tali vescicole.

# Materiali e Metodi

## Materiale vegetale di partenza

In questo lavoro sono state utilizzate foglie di *C. arabica* L. appartenenti alla cultivar *Bourbon Red* (BAR).

## Colture cellulari

Le foglie giovani sono state prelevate dalle piante staccandole con delle forbicine, assieme al picciolo. Queste sono state poste in Petri contenenti carta bibula umida, per evitare eccessiva traspirazione durante il trasporto. Le foglie sono state disinfettate attraverso diversi lavaggi.

Il primo lavaggio consisteva nell'eliminare particolato grossolano pulendo, sotto acqua corrente, con detergente commerciale per 10 minuti. Successivamente, sotto cappa a flusso laminare orizzontale, le foglie sono state immerse per 5 minuti nella prima soluzione disinfettante (soluzione di Ipoclorito di Sodio al 2% con 5 gocce di Tween80), e per 30 secondi nella seconda soluzione (Etanolo al 95%). Dopo aver rimosso l'etanolo immergendole in acqua milli-Q sterile, le foglie sono state riposte in mezzo a carta da filtro sterile in modo da asciugarle.

Sempre sotto cappa, con un foratappi, sterilizzato alla fiamma, sono stati ottenuti i dischetti fogliari, i quali sono stati poi posti nei terreni di coltura solidi creati precedentemente; le Petri sono state chiuse con parafilm.

È stato utilizzato il terreno solido di coltura Murashige & Skoog (MS) con la seguente composizione (Tabella 1):

<b>Minerali</b>	<b>Concentrazione (mg/L)</b>
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
EDTA FeNa	40
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.63
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025

*Tabella 1: Composizione minerale del terreno di coltura.*

Al terreno sono stati aggiunti i fitormoni Acido 2,4,5-triclorofenossiacetico (2,4,5-T, auxina) e Chinetina (KT, citochinina) entrambi alla concentrazione di 1 mg/mL per indurre il de-differenziamento degli espianti, assieme a 30 g/L di saccarosio, 1 mg/L di mioinositolo e agar come agente gelificante. Per le fasi successive è stata usata sempre la stessa composizione di terreno.

Gli espianti sono stati posti al buio (coprendoli con un foglio di alluminio), in cella climatica a 28°C.

## Callogenesi

Dopo circa 5 giorni si è effettuato un controllo di contaminazione degli espianti. Il materiale è stato trasferito su terreno fresco dopo 21 giorni dalla messa in coltura. Al 42esimo giorno si è effettuata una raccolta dati prendendo nota del numero di espianti totali, del numero di espianti responsivi e del peso fresco in grammi degli espianti totali. La cappa a flusso laminare e la bilancia di precisione sono state sterilizzate con raggi UV. Quando il callo era cresciuto abbastanza, è stato separato dall'espianto. Il callo è stato spostato su terreno fresco ogni 21 giorni (Figura 6).



*Figura 6: Coltura solida contenente calli di BAR.*

## Sospensioni cellulari

Una volta che il callo ha raggiunto dimensioni sufficienti, si è proceduto con l'inoculo. Calli di 21 giorni, di circa 2 g di peso fresco, sono stati trasferiti in matracci Erlenmeyer con tappo di ventilato Corning® da 250 mL, assieme a 50 mL di terreno MS liquido. Le sospensioni sono state preparate in triplicato.



Le colture liquide sono state poste in agitatore rotante (MaxQ6000, Thermo Fisher Scientific, Ohio, United States) (Figura 7) a 110 rpm,  $26\pm 1$  °C al buio, organizzando subculture ogni 10-12 giorni, prelevando 10 mL di sospensione e aggiungendo 40 mL di terreno fresco. Alla fine della terza subcultura, sono stati misurati il peso fresco e il peso secco delle diverse ripetizioni.



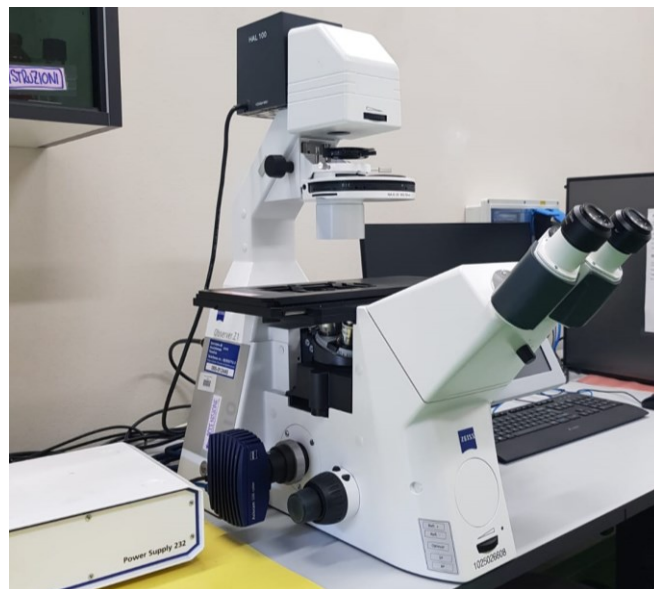
*Figura 7: Agitatore rotante MaxQ6000, Thermo Fisher contenente le sospensioni cellulari.*

## **Curva di crescita**

La costruzione della curva di crescita si è effettuata misurando periodicamente il peso fresco e peso secco delle sospensioni. 1 mL di sospensione cellulare è stato prelevato da ogni replica e posto in una colonna spin QIAprep 2.0 (QIAGEN) pre-tarata. Le colonne sono state centrifugate a 1 rcf per 2 minuti a temperatura ambiente, determinando il peso fresco attraverso la pesata del ritenuto all'interno della colonna. Per il peso secco le colonne sono state lasciate per 48 ore in stufa a 60 °C.

## Conta cellulare

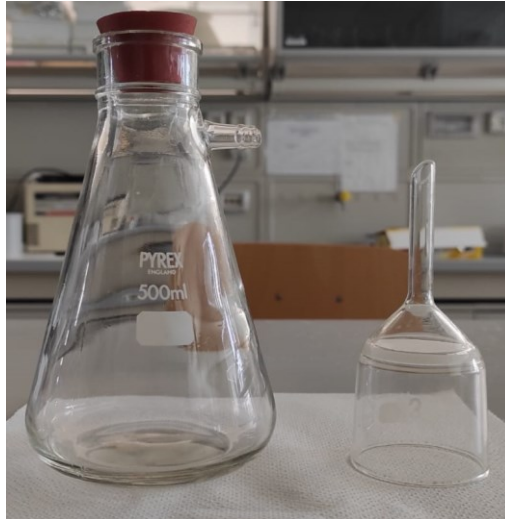
La vitalità cellulare è stata misurata durante l'inoculo e ad intervallo settimanale. Il diacetato di fluorescina (FDA) (4  $\mu$ L di soluzione concentrata 1:5 in tampone fosfato salino, PBS) è stato aggiunto a 200  $\mu$ L di sospensione cellulare. Dopo 4-5 minuti la sospensione è stata posta su un vetrino e coperta con vetrino coprioggetto. Le cellule sono state contate utilizzando microscopio a fluorescenza Zeiss, Axio Observer Z1 (Figura 8), e la percentuale di vitalità è stata calcolata dividendo il numero di cellule fluorescenti per il numero totale di cellule, quest'ultimo valutato utilizzando luce visibile.



*Figura 8: Microscopio a fluorescenza Zeiss, Axio Observer Z1.*

## Isolamento degli esosomi

Inizialmente la sospensione cellulare è stata filtrata attraverso un filtro ad imbuto di vetro sinterizzato Schott duran 3 con pori di dimensione di 1  $\mu$ m (Figura 9). Il flusso è stato stabilito tramite l'utilizzo di una pompa a vuoto collegata ad una beuta flabellata, in maniera tale da separare i materiali più grossolani, cioè le cellule vive, morte o frammenti cellulari, dalla frazione liquida.



**Figura 9:** Sistema di filtraggio con filtro Schott duran 3.

Il filtrato è stato poi sottoposto a diverse centrifugazioni preliminari per rimuovere il materiale grossolano ancora presente. La soluzione è stata centrifugata a 3000 g per 6 minuti utilizzando la centrifuga Beckman Coulter Avanti J-26S XP e un rotore Beckman Coulter JA-25.50, per rimuovere eventuali cellule e frazioni cellulari ancora presenti (Figura 10).



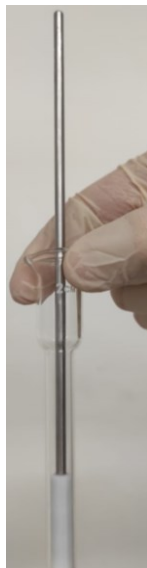
**Figura 10:** Centrifuga Beckman Coulter Avanti J-26S XP e rotore Beckman Coulter JA-25.50

Poi il surnatante, nella stessa supercentrifuga, è stato sottoposto a 12'000 g per 12 minuti per sedimentare eventuali corpi apoptotici e frammenti cellulari. Il surnatante rimanente è stato poi centrifugato per purificare e pellettare le vescicole più piccole, in questo caso gli esosomi, utilizzando un'ultracentrifuga, Beckman Optima LE-80k con un rotore ad angolo fisso Beckman TYPE 70 Ti (Figura 11).



**Figura 11:** Ultracentrifuga Beckman Optima LE-80k e rotore ad angolo fisso Beckman TYPE 70 Ti

La prima centrifugazione era a 100'000 g per 36 minuti, alla fine della quale, il surnatante è stato utilizzato per la successiva centrifugazione, mentre il pellet è stato risospeso in 0,7-1,5 ml di PBS con l'aggiunta di 0,25 M trealosio, trattando la soluzione con un omogeneizzatore di tipo Potter-Elvehjem (Figura 12).



**Figura 12:** Omogeneizzatore di tipo Potter-Elvehjem.

L'ultima centrifugazione era di 6 ore a 125'000 g, il surnatante è stato conservato e il pellet risultante è stato risospeso in modo analogo al precedente.

## Quantificazione del contenuto proteico

Per determinare la quantità di proteina contenuta nei campioni, è stato usato il saggio di Bradford (Bradford, 1979). Per quest'analisi è stata preparata una micropiastra da 96 pozzetti, lasciando liberi i pozzetti perimetrali. Nel saggio sono stati caricati i pellet risospesi dopo la centrifugazione di 36 minuti (P36), quella di 6 ore (P6), e il surnatante della centrifugazione di 6 ore (SURN), assieme ai rispettivi controlli (PBS + trealosio per i pellet, mentre per il surnatante è stato utilizzato il terreno di coltura nel quale si trovavano le cellule di partenza). Ogni campione è stato caricato in triplicato. Per i pellet e il loro controllo sono stati caricati 20  $\mu\text{L}$  a cui sono stati aggiunti 180  $\mu\text{L}$  di Coomassie Brilliant Blue, mentre per il surnatante e il suo controllo sono stati addizionati 100  $\mu\text{L}$  assieme a 100  $\mu\text{L}$  di Coomassie Brilliant Blue. L'assorbanza dei campioni è stata misurata attraverso un lettore di micropiastre Perkin Elmer Victor 3 (Figura 13), misurando l'assorbanza a 595 nm, calcolando la media di 10 letture.



*Figura 13: Lettore di micropiastre Perkin Elmer Victor 3*

La concentrazione proteica è stata ricavata utilizzando delle curve di taratura precedentemente costruite utilizzando concentrazioni note di BSA (Albumina di Siero Bovino). Le concentrazioni per i pellet sono state calcolate utilizzando la seguente equazione:

$$y = 0.8821x - 0.0103$$

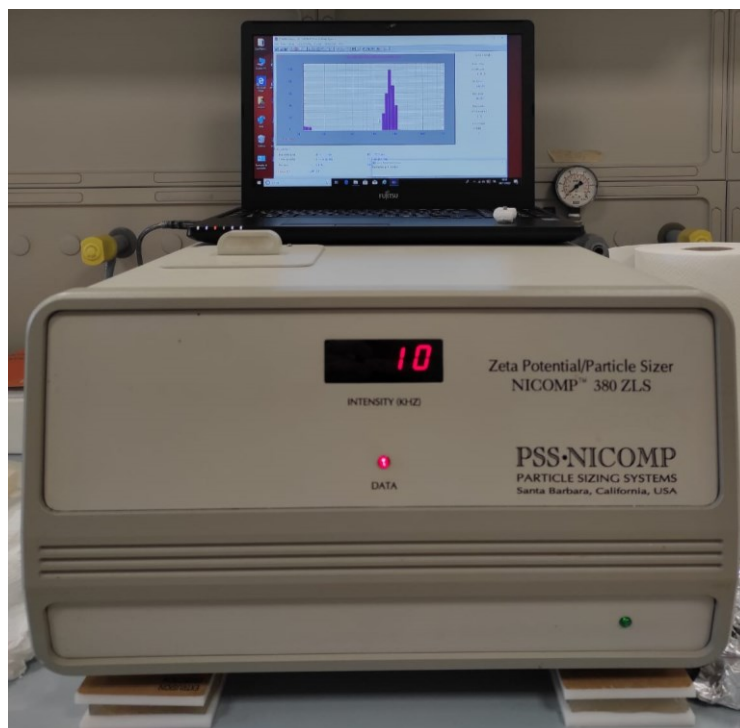
Mentre per il surnatante è stata usata questa equazione:

$$y = 0.012x - 0.0054$$

Con “y” rappresentante l’assorbanza e “x” la concentrazione proteica (mg/ml per i pellet mentre  $\mu\text{g/ml}$  per il surnatante).

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

Utilizzando il saggio di diffusione dinamica della luce (DLS, Dynamic Light Scattering), con lo strumento NICOMP 380 ZLS *Particle Sizer* (Figura 14), sono state determinate le dimensioni delle particelle e il loro potenziale  $\zeta$ . A 100  $\mu\text{L}$  dei campioni P36, P6 e SURN sono stati aggiunti 2.9 mL di acqua bidistillata. In seguito, i campioni sono stati immessi in cuvette trasparenti e inseriti nello strumento per l’analisi.



*Figura 14: NICOMP 380 ZLS Particle Sizer.*



## Elettroforesi

Per caratterizzare le proteine contenute negli esosomi di caffè è stata utilizzata un'elettroforesi verticale su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE). Per la preparazione dei gel e per effettuare la corsa elettroforetica sono state preparate le seguenti soluzioni e tamponi:

- Tris Glicina (0.5 L): Glicina 7.2 g + Tris 1.5 g;
- Tris Glicina-SDS (150 mL): 150 mL di Tris Glicina + 0.15 g SDS (0.1%);
- Tampone R (50 mL): 37.5 g Glicerolo (75%);
- 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.

Sono stati preparati 20 mL di *running* gel al 12% addizionando: 8.9 mL di acqua bidistillata, 5 mL di tampone L, 6 mL di Acrilogel 40% seguiti dagli agenti gelificanti 100  $\mu$ L NPS e 6  $\mu$ L Temed. Circa 6.5 mL di questa soluzione sono stati versati nello stampo per elettroforesi, precedentemente preparato nell'apposito supporto. Per livellare il gel è stata aggiunta qualche goccia di alcool isobutilico. Dopo che la soluzione si è gelificata, sono stati rimossi l'alcool e l'acqua di spurgo del gel. Il tutto è stato lavato con acqua distillata e infine i vetrini sono stati asciugati all'interno con carta assorbente tipo bibula.

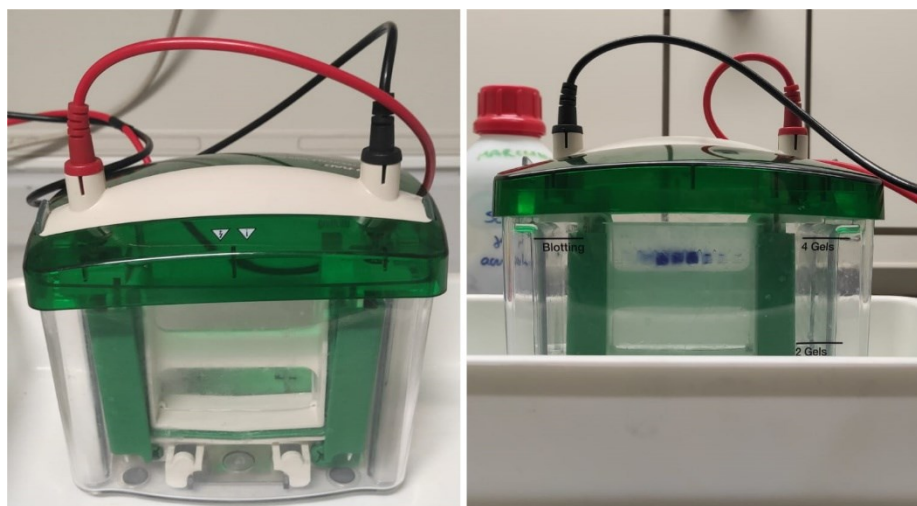
Preparazione dello *stacking* gel: 4.2 mL di acqua bidistillata, 2 mL di tampone M, 1 mL di tampone R, 40  $\mu$ L di NPS e 6  $\mu$ L di Temed. Questa soluzione è stata versata sopra al running gel lasciando circa 2 mm dal bordo superiore dei vetrini. Un pettine di plastica è stato inserito all'interno di tale soluzione per creare i pozzetti di caricamento. Il pettine è stato rimosso a seguito della gelificazione.

I campioni utilizzati per questa analisi sono stati P36, P6 e un controllo di cellule di caffè. Per il caricamento dei campioni si preparano 5  $\mu$ L di Blu di bromofenolo, 5  $\mu$ L di tampone R, 5  $\mu$ L di tampone M, 5  $\mu$ L di SDS 10 % (p/v) e 30  $\mu$ L di ogni campione.

I campioni possono essere diluiti, utilizzando le informazioni ricavabili dai dati ottenuti con il saggio di Bradford, per ottenere campioni con la stessa quantità di proteina.

Il campione di cellule è stato pretrattato con 4 M urea, SDS 1% e 5  $\mu$ L di mercaptoetanolo e poi, assieme agli altri campioni, sono stati immersi per 3 min in acqua a 100°C forando preventivamente il loro tappo. Solo il campione di cellule è stato centrifugato per qualche secondo per far precipitare le porzioni più grossolane per utilizzare solo il surnatante.

Nel gel sono stati caricati i campioni, utilizzando delle siringhe, seguendo il seguente ordine: Ladder proteico della ditta Thermo Scientific (PageRuler Prestained Protein Ladder), il controllo di cellule di caffè, P36 e P6, lasciando i pozzetti più esterni liberi.



*Figura 15: Corsa elettroforetica.*

Per l'analisi è stata utilizzata la cella per elettroforesi verticale Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra (Figura 15). La corsa elettroforetica è stata preparata versando Tris Glicina-SDS nello spazio delimitato dai vetrini, coprendo anche i pozzetti, mentre i 350 mL rimanenti di Tris Glicina, priva di SDS, sono stati aggiunti all'esterno, nella vaschetta contenete i vetrini. La vaschetta è stata chiusa e, collegati gli elettrodi, si è fatta partire la corsa applicando una corrente di 30 mA, nel caso di un singolo gel, o 40 mA nel caso di due gel.



A seguito della corsa, lo *stacking* gel è stato rimosso attraverso l'uso di un bisturi ed è stato tagliato l'angolo in alto a sinistra del *running* gel. Il gel è stato trattato con 100 mL di acido acetico 7.5% (v/v) per 6-7 minuti in agitazione, incubandolo poi per una notte in una soluzione di Blu di Comassie, sempre in agitazione. Il giorno successivo, dopo diversi lavaggi con acqua, le bande proteiche erano visibili.

## Western blot

Soluzioni necessarie per l'*immunoblotting*:

- Tampone di trasferimento 200 mL: 0.6 g Tris + 2.88 g glicina + 40 mL metanolo;
- Soluzione Rosso Ponceau S 100 mL: Rosso Ponceau S 0.2 g + acido acetico 5 mL;
- TBS (*Tris Buffer Saline*) 2 L: 10 mM Tris-HCl pH 7.5 2.42 g + 150 mM NaCl 17.52 g;
- Tampone di saturazione 100 mL: 100 mL TBS + 3% (p/v) BSA 3 g;
- Tampone di incubazione degli anticorpi 35 mL: 35 mL TBS + 0.05% Tween 20 143  $\mu$ L + 0.5% (p/v) BSA 0.175 g;
- Tampone di lavaggio degli anticorpi 400 mL: 400 mL TBS + 0.05% (v/v) Tween 20 0.2 mL;
- Tampone di sviluppo 10 mL: si prepara poco prima dell'uso. Si scioglie un Tablet (*Sigma B-5655*) in 10 mL di acqua bidistillata, mantenendo la soluzione riparata dalla luce.

In questo studio è stato utilizzato il protocollo del "*semi-dry immunoblotting*". Il gel ottenuto dall'elettroforesi è stato lasciato equilibrare per 30 minuti nel tampone di trasferimento. Lo stesso trattamento è stato applicato anche alla membrana di nitrocellulosa e ai filtri.

È stata utilizzata la cella di trasferimento Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Figura 16), sulla quale sono stati posti, nel seguente ordine, un filtro, la membrana di nitrocellulosa, il gel e un secondo filtro. Lo strumento è stato chiuso e le proteine vengono trasferite collegando ad un generatore impostando corrente costante a 15 V, con un massimo di 250 mA per 1 ora e 30 minuti.



*Figura 16: Cella di trasferimento Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*

Al termine del trasferimento, la membrana di nitrocellulosa è stata rimossa, l'angolo in alto a sinistra è stato tagliato e la membrana è stata immersa nella soluzione Rosso Ponceau S per 10 minuti. Con una matita leggera sono stati fatti dei puntini alle estremità delle varie corsie per evidenziare la presenza dei campioni. In questa analisi i campioni sono stati caricati seguendo questo ordine: Ladder proteico, controllo di cellule, P36 e P6.

Sono seguiti poi 3 lavaggi in TBS per eliminare la colorazione rossa di fondo, facendo attenzione che le bande non si decolorino.

Per saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è stata lasciata in agitazione nel tampone di saturazione per 60 minuti. Sono seguiti poi 3 lavaggi in TBS. La

membrana è stata poi messa in incubazione con l'anticorpo primario in contenitori posti in agitazione per tutta la notte a 37°C.

In questa analisi sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- Agrisera AS07 260 H<sup>+</sup>-ATPasi, diluizione 1:2000. Lega l'ATPasi di plasmalemma e può riconoscere proteine omologhe derivanti da monocotiledoni, dicotiledoni, felci, muschi e alghe.
- Agrisera AS07 213 V-ATPasi, diluizione 1:1000. Lega la subunità E dell'ATPasi del vacuolo.
- Agrisera AS08 327 Sec21p, diluizione 1:1000. In grado di legare antigeni associati all'apparato dei Golgi di *Arabidopsis thaliana*.
- Agrisera AS12 2365 CNX1/2, diluizione 1:2000. Riconosce calnessina 1 e 2 di *A. thaliana*, antigeni del reticolo endoplasmico.

Questi anticorpi ottenuti commercialmente, sono in grado di reagire con le proteine di *A. thaliana* ma, essendo policlonali, possono essere utilizzati per rilevare proteine simili in queste vescicole derivanti dal caffè.

La membrana è stata lavata 4 volte con il tampone di lavaggio degli anticorpi con volume totale di 200 mL per un tempo totale di 20 minuti. Segue poi l'incubazione con anticorpo secondario per 1 ora e 30 minuti a 37°C. In questa fase sono stati utilizzati anticorpi *anti-rabbit* coniugati con la fosfatasi alcalina con diluizione 1:5000. Terminata l'incubazione, la membrana è stata lavata 3 volte con il tampone di lavaggio degli anticorpi, con volume totale di 150 mL, e 2 volte con TBS per un volume totale di 100 mL, per un tempo totale di 30 minuti.

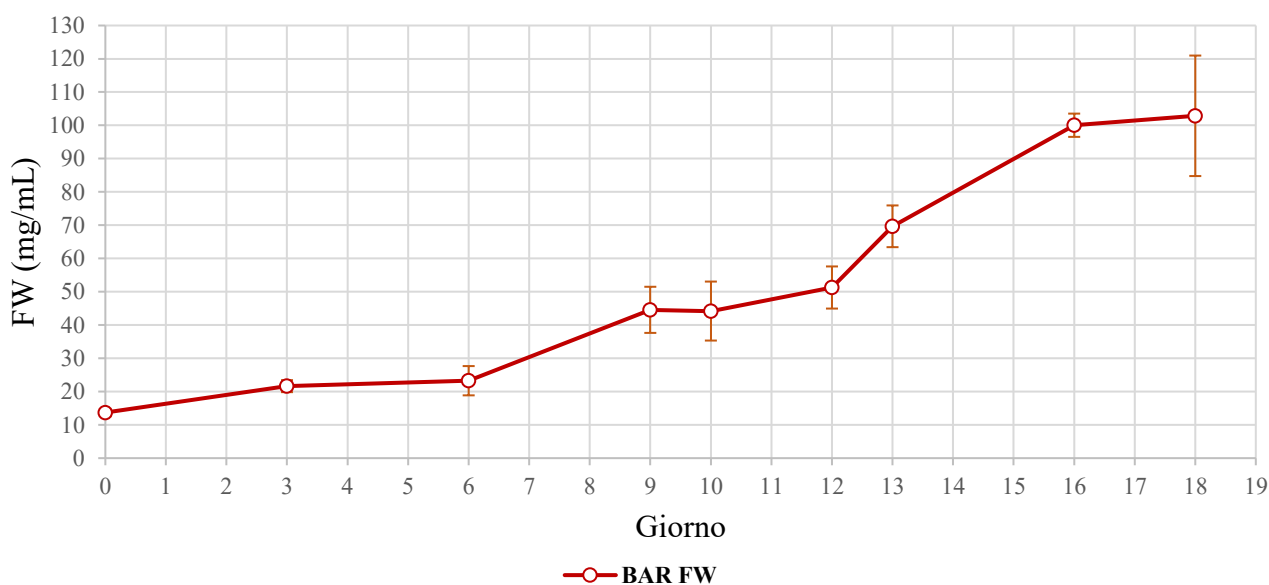
Per lo sviluppo è stato preparato il tampone di sviluppo come sopra indicato, posto in una Petri nella quale viene immersa la membrana. In questa fase è stato seguito lo sviluppo delle bande, bloccando la reazione con acqua distillata quando la colorazione aveva raggiunto l'intensità desiderata.

# Risultati e discussione

## Curve di crescita

Le curve di crescita sono state costruite in modo da seguire la crescita delle sospensioni cellulari, per determinare quando eseguire le subculture per perpetuare le colture. Come indicato, le curve sono state costruite rilevando periodicamente il peso fresco (FW) e il peso secco (DW), in triplicati, delle sospensioni di BAR.

### Curve di crescita, peso fresco

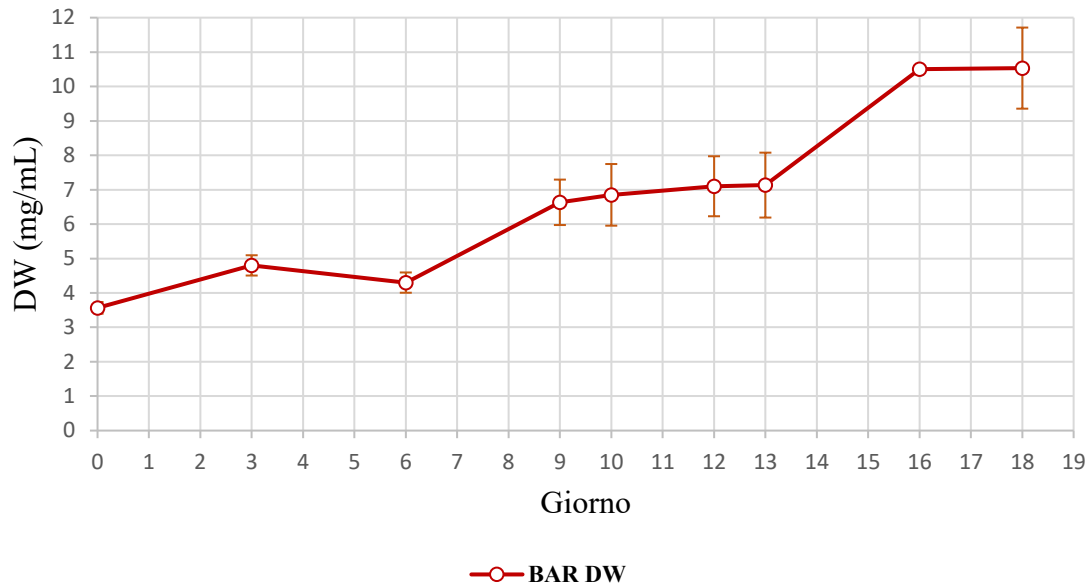


*Figura 17: Curva di crescita del peso fresco, valori medi.*

Analizzando la curva di crescita del peso fresco (Figura 17) si può notare un'iniziale fase di lag nei primi 6 giorni, seguita da una fase di crescita esponenziale, raggiungendo rapidamente al giorno 18 la fase stazionaria, con valore massimo di peso fresco di 102.87 mg/mL. A seguito di questa rapida crescita, non è stato possibile eseguire una misura oggettiva al giorno 20, data l'elevata densità cellulare che ha creato un omogenato quasi privo di parte liquida, e di conseguenza il dato non è stato ottenuto.

Risultati analoghi si riscontrano osservando la curva di crescita del peso secco (Figura 18). Alla luce dei risultati di questa analisi, si è stabilito per la varietà BAR di eseguire la subcultura ogni 17 giorni.

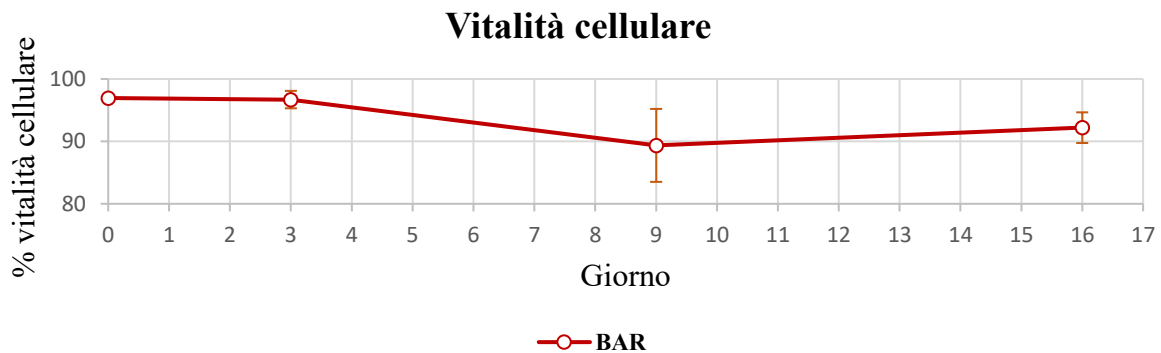
### Curve di crescita, peso secco



*Figura 18: Curve di crescita del peso secco, valori medi.*

### Vitalità cellulare

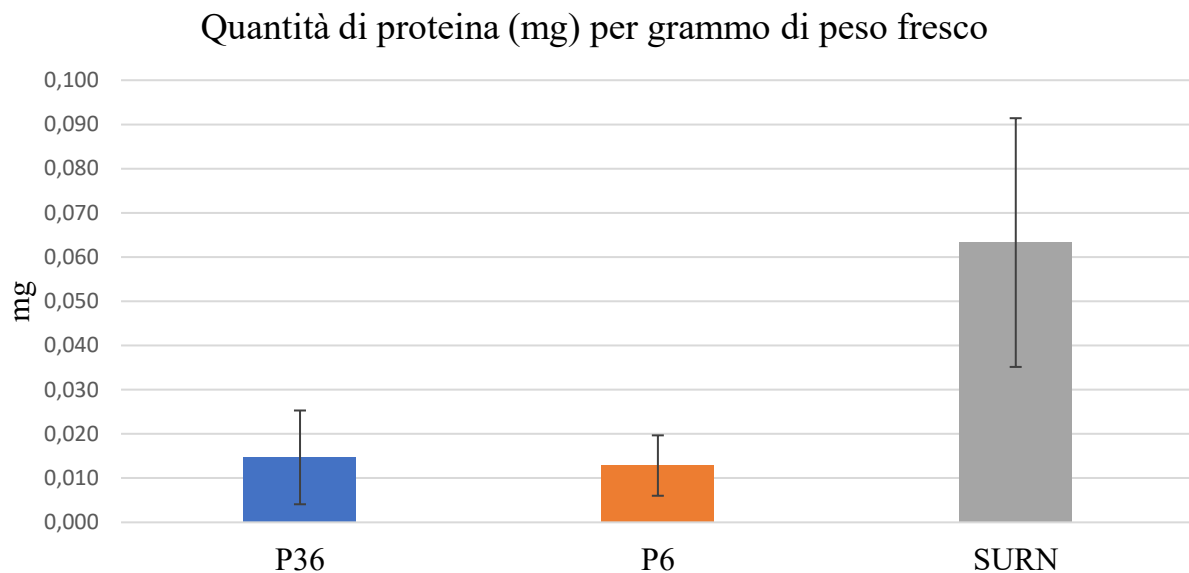
Come indicato, le sospensioni sono state osservate con un microscopio a fluorescenza, determinando la vitalità cellulare sfruttando la fluorescenza derivata dal trattamento con FDA. Anche in questo caso le misure sono state eseguite in triplicato (Figura 19). La varietà BAR ha mantenuto livelli di vitalità elevati durante lo studio, seppure sia stata osservata una leggera diminuzione al giorno 3.



*Figura 19: Vitalità cellulare, valori medi.*

## Saggio di Bradford

Attraverso i dati ottenuti dal saggio di Bradford, è stata stimata la quantità media di proteina presente nei campioni analizzati su grammo di peso fresco delle cellule di BAR usate (Figura 20).



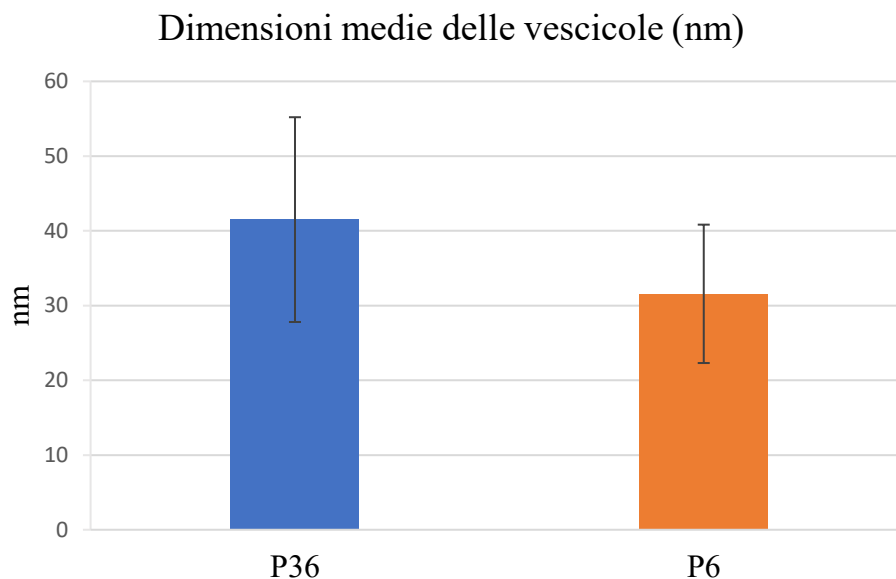
**Figura 20:** Risultato del saggio di Bradford come quantità di proteina (mg) per grammo di peso fresco.

Nonostante l'elevata variabilità dei dati, osservando i risultati si nota un'elevata quantità di proteine nel surnatante, quattro volte in più rispetto alle quantità presenti in P36 e P6.

Dato che questi campioni derivano da un filtrato cellulare, la frazione proteica presente nel surnatante è costituita da proteine solubili. Invece le frazioni P36 e P6 rappresentano la porzione di esosomi purificata, dove si può notare una quantità di proteine associate a queste vescicole leggermente superiore nella frazione P6.

## Dimensioni delle particelle e potenziale Zeta

Usando il saggio di DLS è stato possibile determinare le dimensioni e carica delle vescicole presenti nelle frazioni analizzate. Nonostante la variabilità dei risultati si può osservare che le dimensioni del campione P6 siano inferiori a quelle di P36 (Figura 21). L'ampia distribuzione registrata per la frazione P36 potrebbe essere dovuta ad una mancanza di un sistema standardizzato per la coltura in sospensione delle cellule di caffè e l'isolamento delle loro vescicole.



*Figura 21: Risultati del saggio di DLS, dimensioni medie delle vescicole.*

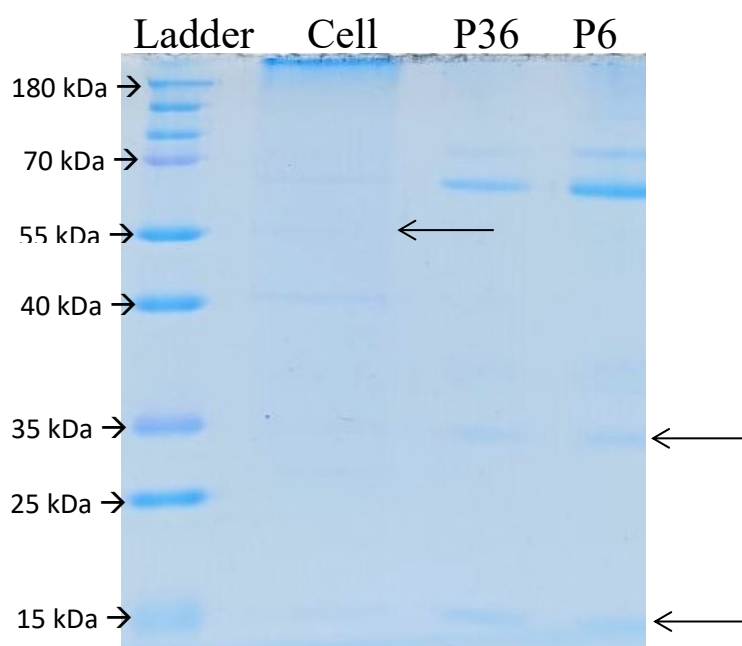
Per quanto riguarda il potenziale  $\zeta$ , i valori registrati variano in un intervallo tra -0.7 a 1.7 mV. Essendo molto vicini allo zero, suggerisce che la variabilità dei dati potrebbe essere in parte dovuta all'aggregazione di queste vescicole.

Come illustrato nel lavoro di Shkryl e colleghi (2022), le dimensioni e carica superficiale degli esosomi isolati dalle piante può variare notevolmente tra specie diverse. Inoltre, confrontando i nostri risultati con quelli dello studio di Kantarcıoğlu e collaboratori (2023), si notano differenze rispetto ai nostri risultati; infatti, nel loro lavoro hanno identificato vescicole comprese tra 10 e 80 nm. Tali discrepanze possono essere date dalla fonte d'origine degli esosomi, nel nostro caso derivanti da sospensioni indotte da espianti fogliari, mentre, nel loro studio, da bevande calde di caffè. In ogni

caso, i nostri risultati comunque evidenziano vescicole comprese in un intervallo di dimensioni comparabile a quello degli esosomi ottenuti nel lavoro sopra citato.

## Elettroforesi

L'analisi con SDS-PAGE ha permesso un'iniziale separazione delle proteine presenti nei campioni, identificando bande corrispondenti a diverse masse molecolari (Figura 22). I campioni sono stati caricati con la stessa quantità proteica di 0.06 mg, permettendo il confronto dei risultati ottenuti. Analizzando le bande colorate dall'alto verso il basso si può evidenziare come il campione di cellule presenti una principale banda sopra ai 180 kDa, seguita da bande molto più deboli poco al di sotto dei 70 kDa, a 55 kDa, a 40 kDa e a 15 kDa.



*Figura 22: Corsa elettroforetica.*

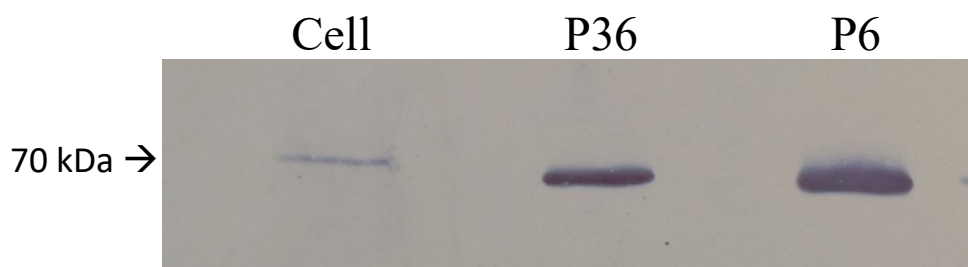
Invece, i campioni P36 e P6, presentano bande attorno ai 70 kDa, delle bande molto evidenti tra i 70 e 55 kDa, mentre, tra i 40 e 35 kDa, a 35 kDa e a livello di 15 kDa si possono osservare delle bande molto deboli. Le bande attorno ai 70 kDa e tra i 70 e 55 kDa, del campione P6 sono più intense rispetto a quelle del campione P36.



Questi risultati mostrano come le frazioni corrispondenti agli esosomi contengano una diversa popolazione di proteine, rispetto al campione di cellule. L'intensità maggiore riscontrata in P6 rispetto a P36 è concorde con le osservazioni riportate nel saggio di Bradford.

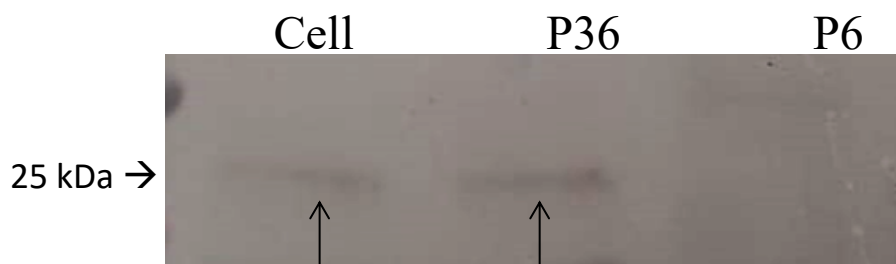
## Western blot

Attraverso questo saggio è stato possibile determinare alcune componenti proteiche sulla superficie di queste vescicole in modo da determinarne l'origine cellulare.



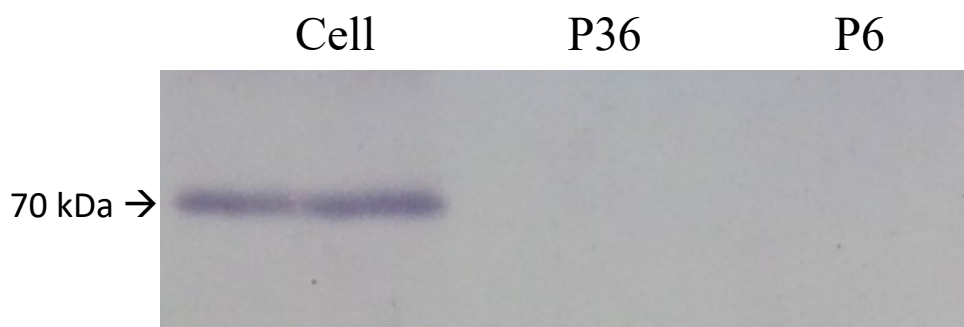
*Figura 23: Reazione dell'anticorpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasi.*

L'analisi con l'anticorpo anti-H<sup>+</sup>-ATPasi di plasmalemma (Figura 23), ha riscontrato una banda in tutti i campioni, attorno ai 70 kDa. Le bande sono ben visibili in P36 e P6 rispetto al controllo e la banda in P36 è leggermente più debole rispetto quella in P6.



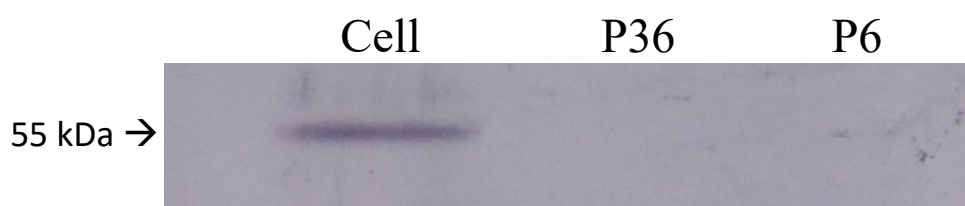
*Figura 24: Reazione dell'anticorpo anti-V-ATPasi.*

Nella reazione con l'anticorpo anti-V-ATPasi (Figura 24), si notano deboli bande, sopra i 25 kDa, nel controllo e in P36, ma nessuna banda in P6.



**Figura 25:** Reazione dell'anticorpo anti-CN XI/2.

Mentre utilizzando l'anticorpo anti-CN XI/2 (Figura 25), si riscontra solo una banda nel controllo attorno ai 70 kDa.



**Figura 26:** Reazione dell'anticorpo anti-Sec21p.

Infine, anche la reazione dell'anticorpo anti-Sec21p (figura 26), presenta una banda solo nel controllo attorno ai 55 kDa.

Le osservazioni riportate concordano con l'idea sopra indicata di una diversa popolazione proteica nelle frazioni contenenti gli esosomi. I risultati ottenuti da quest'analisi suggeriscono che la composizione di membrana delle vescicole isolate nelle frazioni P36 e P6 derivi principalmente dal plasmalemma. La frazione P36, inoltre, presenta un debole segnale per la V-ATPasi di vacuolo, indicando che parte delle vescicole isolate abbiano origine dalla membrana del tonoplasto. Questo risultato rispecchia i dati ottenuti da diversi studi che hanno osservato interazioni tra i MVB e il vacuolo. I MVB prendono contatto con il vacuolo per degradare il loro contenuto, rilasciandolo nel tonoplasto o attraverso il loro inglobamento nel vacuolo (An *et al.*, 2007). Tuttavia, diversi studi suggeriscono che i MVB possano rilasciare le loro ILV all'interno del vacuolo e poi esse possano essere esocitate, attraverso la fusione della membrana del tonoplasto con il plasmalemma (Nemati *et al.*, 2022), inoltre ci sono evidenze del caricamento di componenti vacuolari nei MVB e il loro rilascio nello spazio extracellulare (An *et al.*, 2006). L'assenza di segnale per gli altri anticorpi

suggerisce che le cellule non rilasciano nel mezzo contaminazioni di membrane intracellulari come il Golgi e il Reticolo endoplasmatico.

## Conclusioni

In questo lavoro abbiamo isolato e caratterizzato gli esosomi derivanti da sospensioni cellulari di caffè, focalizzando lo studio su due frazioni, P36 e P6, derivanti da fasi diverse del processo di purificazione. Analizzando le dimensioni delle vescicole di queste frazioni, P6 ha presentato dimensioni comprese tra 22 e 41 nm, suggerendo che potrebbero trattarsi effettivamente di esosomi. Mentre la frazione P36, oltre a presentare una maggiore eterogeneità dei dati, contiene vescicole di dimensioni nettamente superiori a quelle di P6, ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di aggregazioni tra le vescicole o la precipitazione di materiali grossolani ancora presenti. Per quanto riguarda la loro origine, attraverso le analisi con Western blot abbiamo riscontrato che queste vescicole vengono generate principalmente a livello di plasmalemma, in accordo con la loro biogenesi. Inoltre, nella frazione P36 è stato identificato un debole segnale associato al vacuolo, suggerendo che almeno parte di queste vescicole abbiano origine a livello del tonoplasto.

Le analisi svolte in questa tesi si sono concentrate sul determinare le dimensioni di queste vescicole e i compartimenti cellulari da cui originano, ma per comprendere meglio le caratteristiche degli esosomi saranno necessari, in futuro, studi sulla composizione proteica, lipidica e soprattutto la caratterizzazione degli acidi nucleici trasportati da questi vettori, oltre che ai possibili metaboliti secondari presenti. Queste informazioni saranno utili per capire i meccanismi terapeutici legati agli esosomi del caffè, oltre che quelli delle piante in generale. Inoltre, è necessario standardizzare il metodo di isolamento, in modo da ridurre la variabilità dei risultati e purificare una popolazione dimensionalmente più omogenea.

Come menzionato sopra, gli esosomi rappresentano un importante potenziale strumento in ambito diagnostico e terapeutico, offrendo la possibilità di creare vettori per il trasporto di farmaci, oltre che permettere diagnosi non invasive. Inoltre, l'utilizzo

di sospensioni cellulari permetterebbe una produzione su larga scala a costi ridotti, dato che gli esosomi possono essere isolati dal terreno di scarto derivato dalle subculture.

In conclusione, siamo riusciti a isolare esosomi da sospensioni cellulari di caffè dimostrando l'efficacia e la relativa semplicità della tecnica, aprendo la strada a possibili analisi future per queste interessanti vescicole extracellulari.

## **Bibliografia**

Abdelwareth A. (2021). Metabolites Profiling of Coffee Seeds in Context to their Origin, Processing and Gut Microbiota Interaction [Master's Thesis, the American University in Cairo]. AUC Knowledge Fountain.

Al-Asmari K.M., Zeid I.M.A., & Al-Attar A.M. (2020). Medicinal Properties of Arabica coffee (*Coffea arabica*) Oil: An Overview, 8. 20-29.

An Q., Hüchelhoven R., Kogel K.H., & van Bel A.J. (2006). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular microbiology*, 8(6). 1009–1019.

An Q., van Bel A.J., & Hüchelhoven R. (2007). Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?. *Plant signaling & behavior*, 2(1). 4–7.

Arora M. (2013). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, 3. 175.

Ascough G.D., & Fennell C.W. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany*, 70(2). 181-190.

Batista B.S., Eng W.S., Pilobello K.T., Hendricks-Muñoz K.D., & Mahal L.K. (2011). Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *Journal of proteome research*, 10(10). 4624–4633.

Bhatia S. (2015a). Application of Plant Biotechnology. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. 157-207.

Bhatia S. (2015b). Plant tissue culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*. 31–107.

Bhatia S., & Dahiya R. (2015). Concepts and techniques of plant tissue culture science. *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*. 121–156.

Borges F.T., Reis L.A., & Schor N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 46(10). 824–830.

Bourgaud F., Gravot A., Milesi S., & Gontier E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science*, 161. 839-851.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72. 248–254.

Campa C., Mondolot L., Rakotondravao A., Bidel L.P., Gargadennec A., Couturon E., La Fisca P., Rakotomalala J.J., Jay-Allemand C., & Davis A.P. (2012). A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Annals of botany*, 110(3). 595–613.

Cangeloni L., Bonechi C., Leone G., Consumi M., Andreassi M., Magnani A., Rossi C., & Tamasi G. (2022). Characterization of Extracts of Coffee Leaves (*Coffea arabica* L.) by Spectroscopic and Chromatographic/Spectrometric Techniques. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(16). 2495.

Cano A., Muñoz-Morales Á., Sánchez-López E., Ettcheto M., Souto E.B., Camins A., Boada M., & Ruíz A. (2023). Exosomes-Based Nanomedicine for Neurodegenerative Diseases: Current Insights and Future Challenges. *Pharmaceutics*, 15(1). 298.

Castro A.C.C.M., Oda F.B., Almeida-Cincotto M.G.J., Davanço M.G., Chiari-Andréo B.G., Cicarelli R.M.B., Peccinini R.G., Zocolo G.J., Ribeiro P.R.V., Corrêa M.A., Isaac V.L.B., & Santos A.G. (2018). Green coffee seed residue: A sustainable source of antioxidant compounds. *Food chemistry*, 246. 48–57.

Cavin C., Holzhaeuser D., Scharf G., Constable A., Huber W.W., & Schilter B. (2002). Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 40(8). 1155–1163.

Chan B.D., Wong W.Y., Lee M.M., Cho W.C., Yee B.K., Kwan Y.W., & Tai W.C. (2019). Exosomes in Inflammation and Inflammatory Disease. *Proteomics*, 19(8). e1800149.



Chandran H., Meena M., Barupal T., & Sharma K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 26. e00450.

Choi D.S., Kim D.K., Kim Y.K., & Gho Y.S. (2015). Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass spectrometry reviews*, 34(4). 474–490.

de Melo Pereira G.V., de Carvalho Neto D.P., Júnior A.I.M., do Prado F.G., Pagnoncelli M.G.B., Karp S.G., & Soccol C.R. (2020). Chemical composition and health properties of coffee and coffee by-products. *Advances in food and nutrition research*, 91. 65-96.

Farley J.T., Eldahshoury M.K., & de Marcos Lousa C. (2022). Unconventional Secretion of Plant Extracellular Vesicles and Their Benefits to Human Health: A Mini Review. *Frontiers in cell and developmental biology*, 10. 883841.

Gaglani S., Gonzalez-Kozlova E., Landon D.J., Tewari A.K., Dogra N., & Kyprianou N. (2021). Exosomes as A Next-Generation Diagnostic and Therapeutic Tool in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(18). 10131.

Ghidoni R., Benussi L., & Binetti G. (2008). Exosomes: the Trojan horses of neurodegeneration. *Medical hypotheses*, 70(6). 1226–1227.

Gonzalez de Mejia E., & Ramirez-Mares M.V. (2014). Impact of caffeine and coffee on our health. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 25(10). 489–492.

Granados-Vallejo M., Arriola-Guevara E., Corona-González R.I., Flores-Méndez D.A., Padilla-de la Rosa J.D., Esquivel-Solis H., Pelayo-Ortiz C., & Guatemala-Morales G.M. (2022). Optimization of 5-CQA Extraction Conditions from Green Coffee By-Product (*Coffea arabica*) Using a Response-Surface Design and the Study of Its Extraction Kinetics. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(17). 5704.

Guerriero G., Berni R., Muñoz-Sanchez J.A., Apone F., Abdel-Salam E.M., Qahtan A.A., Alatar A.A., Cantini C., Cai G., Hausman J.F., Siddiqui K.S., Hernández-Sotomayor S.M.T., & Faisal M. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*, 9(6). 309.

Gullon B., Lu-Chau T.A., Moreira M.T., Lema J.M., Eibes G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 67. 220–235.

Guo X.R., Ma Y., Ma Z.M., Dai T.S., Wei S.H., Chu Y.K., & Dan X.G. (2023). Exosomes: The role in mammalian reproductive regulation and pregnancy-related diseases. *Frontiers in physiology*, 14. 1056905.

Gurung S., Perocheau D., Touramanidou L., & Baruteau J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell communication and signaling : CCS*, 19(1). 47.

Ha D., Yang N., & Nadithe V. (2016). Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 6(4). 287–296.

Han L., Zhao Z., Yang K., Xin M., Zhou L., Chen S., Zhou S., Tang Z., Ji H. & Dai R. (2022). Application of exosomes in the diagnosis and treatment of pancreatic diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1). 153.

Hansen L.L., & Nielsen M.E. (2017). Plant exosomes: using an unconventional exit to prevent pathogen entry?. *Journal of experimental botany*, 69(1). 59–68.

Hoseini M., Cocco S., Casucci C., Cardelli V., & Corti G. (2021). Coffee by-products derived resources. A review. *Biomass and Bioenergy*, 148. 106009.

Ju S., Mu J., Dokland T., Zhuang X., Wang Q., Jiang H., Xiang X., Deng Z.B., Wang B., Zhang L., Roth M., Welti R., Mobley J., Jun Y., Miller D., & Zhang H.G. (2013). Grape exosome-like nanoparticles induce intestinal stem cells and protect mice from DSS-induced colitis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(7). 1345–1357.

Kalluri R., & LeBleu V.S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6478). eaau6977.

Kanninen K.M., Bister N., Koistinaho J., & Malm T. (2016). Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(3). 403–410.

Kantarcıoğlu M., Yıldırım G., Akpınar Oktar P., Yanbakan S., Özer Z.B., Yurtsever Sarıca D., Taşdelen S., Bayrak E., Akın Balı D.F., Öztürk S., Akçalı K.C., Ezer Ü., & Kürekçi A.E. (2023). Coffee-Derived Exosome-Like Nanoparticles: Are They the Secret Heroes?. *The Turkish journal of gastroenterology : the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 34(2). 161–169.

Kim J., Li S., Zhang S., & Wang J. (2022). Plant-derived exosome-like nanoparticles and their therapeutic activities. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 17(1). 53–69.

Kim M.K., Choi Y.C., Cho S.H., Choi J.S., & Cho Y.W. (2021). The Antioxidant Effect of Small Extracellular Vesicles Derived from Aloe vera Peels for Wound Healing. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 18(4). 561–571.

Krasteva G., Georgiev V., & Pavlov A. (2020). Recent applications of plant cell culture technology in cosmetics and foods. *Engineering in life sciences*, 21(3-4). 68–76.

Kumar P.P., & Loh C.S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. In *Plant biotechnology and agriculture*. 131-138.

Li D.F., Tang Q., Yang M.F., Xu H.M., Zhu M.Z., Zhang Y., Tian C.M., Nie Y.Q., Wang J.Y., Liang Y.J., Wang L.S., & Yao J. (2023). Plant-derived exosomal nanoparticles: potential therapeutic for inflammatory bowel disease. *Nanoscale advances*, 5(14). 3575–3588.

Li S.P., Lin Z.X., Jiang X.Y., & Yu X.Y. (2018a). Exosomal cargo-loading and synthetic exosome-mimics as potential therapeutic tools. *Acta pharmacologica Sinica*, 39(4). 542–551.

Li Z., Wang H., Yin H., Bennett C., Zhang H.G., & Guo P. (2018b). Arrowtail RNA for Ligand Display on Ginger Exosome-like Nanovesicles to Systemic Deliver siRNA for Cancer Suppression. *Scientific reports*, 8(1). 14644.

Lin Y.-H., Pan T.-M., Wu M.-H., Miri A.K., & Nieto D. (2019). Microfluidic Technology and Its Biological Applications. *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, 5. 62-80.

Liu F., Wang X., Wu G., Chen L., Hu P., Ren H., & Hu H. (2015). Coffee Consumption Decreases Risks for Hepatic Fibrosis and Cirrhosis: A Meta-Analysis. *PloS one*, 10(11). e0142457.

Liu G., Kang G., Wang S., Huang Y., & Cai Q. (2021). Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. *Frontiers in plant science*, 12. 757925.

Logozzi M., Di Raimo R., Mizzoni D., & Fais S. (2022). The Potentiality of Plant-Derived Nanovesicles in Human Health-A Comparison with Human Exosomes and Artificial Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 23(9). 4919.

Ludwig I.A., Clifford M.N., Lean M.E., Ashihara H., & Crozier A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & function*, 5(8). 1695–1717.

Lv H., Liu H., Sun T., Wang H., Zhang X., & Xu W. (2022). Exosome derived from stem cell: A promising therapeutics for wound healing. *Frontiers in pharmacology*, 13. 957771.

Moffat A.S. (1995). Plants as Chemical Factories. *Science*, 268. 659-659.

Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Sullivan M.L., Stolz D.B., Papworth G.D., Zahorchak A.F., Logar A.J., Wang Z., Watkins S.C., Falo L.D., Jr & Thomson A.W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10). 3257–3266.

Moscatiello R., Baldan B., & Navazio L. (2013). Plant cell suspension cultures. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 953. 77–93.

Mu N., Li J., Zeng L., You J., Li R., Qin A., Liu X., Yan F., & Zhou Z. (2023). Plant-Derived Exosome-Like Nanovesicles: Current Progress and Prospects. *International journal of nanomedicine*, 18. 4987–5009.

Nagarajah S. (2016). Exosome Secretion - More Than Simple Waste Disposal? Implications for Physiology, Diagnostics and Therapeutics. *Journal of circulating biomarkers*, 5. 7.

Ncube B., & Van Staden J. (2015). Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit. *Molecules* (Basel, Switzerland), 20(7). 12698–12731.

Nemati M., Singh B., Mir R.A., Nemati M., Babaei A., Ahmadi M., Rasmi Y., Golezani A.G., & Rezaie J. (2022). Plant-derived extracellular vesicles: a novel nanomedicine approach with advantages and challenges. *Cell communication and signaling : CCS*, 20(1). 69.

Orefice N.S., Di Raimo R., Mizzoni D., Logozzi M., & Fais S. (2023). Purposing plant-derived exosomes-like nanovesicles for drug delivery: patents and literature review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 33(2). 89–100.

Ozyigit I.I., Dogan I., Hocaoglu-Ozyigit A., Yalcin B., Erdogan A., Yalcin I.E., Cabi E., & Kaya Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 14. 1132555.

Patil A.A., & Rhee W.J. (2019). Exosomes: biogenesis, composition, functions, and their role in pre-metastatic niche formation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24. 689-701.

Patra J.K., Das G., Das S.K., & Thatoi H. (2020). Plant tissue culture techniques and nutrient analysis. *A Practical Guide to Environmental Biotechnology*. 135-164.

Pietzner M., Köhrle J., Lehmpful I., Budde K., Kastenmüller G., Brabant G., Völzke H., Artati A., Adamski J., Völker U., Nauck M., Friedrich N., & Homuth G. (2019). A Thyroid Hormone-Independent Molecular Fingerprint of 3,5-Diiodothyronine Suggests a Strong Relationship with Coffee Metabolism in Humans. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*, 29(12). 1743–1754.

Rao K., Chodiseti B., Gandi S., Giri A., & Kavi Kishor P.B. (2022). Cadmium chloride elicitation of *Abutilon indicum* cell suspension cultures for enhanced stigmasterol production. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(3). 613-618.

Record M. (2013). Exosome-like nanoparticles from food: Protective nanoshuttles for bioactive cargo. *Molecular Therapy*, 21(7). 1294-1296.

Rosales-Villarreal M.C., Rocha-Guzmán N.E., Gallegos-Infante J.A., Moreno-Jiménez M.R., Reynoso-Camacho R., Pérez-Ramírez I.F., & González-Laredo R.F. (2019). Significance of bioactive compounds, therapeutic and agronomic potential of non-commercial parts of the *Coffea* tree. *Biotecnia*, 21(3). 143-153.

Sarasati A., Syahrudin M.H., Nuryanti A., Ana I.D., Barlian A., Wijaya C.H., Ratnadewi D., Wungu T.D.K., & Takemori H. (2023). Plant-Derived Exosome-like Nanoparticles for Biomedical Applications and Regenerative Therapy. *Biomedicines*, 11(4). 1053.

Segeritz C.P., & Vallier L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 151–172.



Shahzad A., Parveen S., Sharma S., Shaheen A., Saeed T., Yadav V., Akhtar R., Ahmad Z. & Upadhyay A. (2017). Plant tissue culture: applications in plant improvement and conservation. *Plant Biotechnology: principles and applications*, 37-72.

Shkryl Y., Tsydeneshieva Z., Degtyarenko A., Yugay Y., Balabanova L., Rusapetova T., & Bulgakov V. (2022). Plant exosomal vesicles: perspective information nanocarriers in biomedicine. *Applied Sciences*, 12(16). 8262.

Somers D.A. (2014). *Transgenic Methodologies–Plants*. 289-302.

Soung Y.H., Ford S., Zhang V., & Chung J. (2017). Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers*, 9(1). 8.

Stanly C., Alfieri M., Ambrosone A., Leone A., Fiume I., & Pocsfalvi G. (2020). Grapefruit-Derived Micro and Nanovesicles Show Distinct Metabolome Profiles and Anticancer Activities in the A375 Human Melanoma Cell Line. *Cells*, 9(12). 2722.

Subha D., Harshnii K., Madhikiruba K.G., Nandhini M., Tamilselvi K.S. (2023). Plant derived exosome- like Nanovesicles: an updated overview. *Plant Nano Biology*, 3. 100022.

Suharta S., Barlian A., Hidajah A.C., Notobroto H.B., Ana I.D., Indariani S., Wungu T.D.K., & Wijaya C.H. (2021). Plant-derived exosome-like nanoparticles: A concise review on its extraction methods, content, bioactivities, and potential as functional food ingredient. *Journal of food science*, 86(7). 2838–2850.

Sundaram K., Miller D.P., Kumar A., Teng Y., Sayed M., Mu J., Lei C., Sriwastva M.K., Zhang L., Yan J., Merchant M.L., He L., Fang Y., Zhang S., Zhang X., Park J.W., Lamont R.J., & Zhang H.G. (2019). Plant-Derived Exosomal Nanoparticles Inhibit Pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis*. *iScience*, 21. 308–327.

Surma S., & Oparil S. (2021). Coffee and Arterial Hypertension. *Current hypertension reports*, 23(7). 38.

Sutini, Widiwurjani, Ardianto C., Khotib J., Purwanto D.A., & Muslihatin W. (2020). Production of the secondary metabolite catechin by in vitro cultures of *Camellia sinensis* L. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 31(5). 20190357.

Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., & Conrad R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et biophysica acta*, 1820(7). 940–948.

Wang C., Xu M., Fan Q., Li C., & Zhou X. (2023). Therapeutic potential of exosome-based personalized delivery platform in chronic inflammatory diseases. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 18(1). 100772.

Wang K., Li Y., Ren C., Wang Y., He W., & Jiang Y. (2021). Extracellular Vesicles as Innovative Treatment Strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9. 754630.

Wierzejska R. (2017). Can coffee consumption lower the risk of Alzheimer's disease and Parkinson's disease? A literature review. *Archives of medical science : AMS*, 13(3). 507–514.

Woith E., Guerriero G., Hausman J.F., Renaut J., Leclercq C.C., Weise C., Legay S., Weng A., & Melzig M.F. (2021). Plant Extracellular Vesicles and Nanovesicles: Focus on Secondary Metabolites, Proteins and Lipids with Perspectives on Their Potential and Sources. *International journal of molecular sciences*, 22(7). 3719.

Wu A., Wolley M.J., Fenton R.A., & Stowasser M. (2022). Using human urinary extracellular vesicles to study physiological and pathophysiological states and regulation of the sodium chloride cotransporter. *Frontiers in endocrinology*, 13. 981317.

Xie S., Zhang Q., & Jiang L. (2022). Current Knowledge on Exosome Biogenesis, Cargo-Sorting Mechanism and Therapeutic Implications. *Membranes*, 12(5). 498.

Yang H., Ma Q., Wang Y., & Tang Z. (2020). Clinical application of exosomes and circulating microRNAs in the diagnosis of pregnancy complications and foetal abnormalities. *Journal of translational medicine*, 18(1). 32.

Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V.P., Lockman P., & Bai S. (2015). Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharmaceutical research*, 32(6). 2003–2014.

You J.Y., Kang S.J., & Rhee W.J. (2021). Isolation of cabbage exosome-like nanovesicles and investigation of their biological activities in human cells. *Bioactive materials*, 6(12). 4321–4332.

Younas N., Fernandez Flores L.C., Hopfner F., Höglinger G.U., & Zerr I. (2022). A new paradigm for diagnosis of neurodegenerative diseases: peripheral exosomes of brain origin. *Translational neurodegeneration*, 11(1). 28.

Zeng H., Guo S., Ren X., Wu Z., Liu S., & Yao X. (2023). Current Strategies for Exosome Cargo Loading and Targeting Delivery. *Cells*, 12(10). 1416.

Zhang Y., Liu Y., Liu H., & Tang W.H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9. 19.

Zhao W.J., Bian Y.P., Wang Q.H., Yin F., Yin L., Zhang Y.L., & Liu J.H. (2022). Blueberry-derived exosomes-like nanoparticles ameliorate nonalcoholic fatty liver disease by attenuating mitochondrial oxidative stress. *Acta pharmacologica Sinica*, 43(3). 645–658.

Zhou B., Xu K., Zheng X., Chen T., Wang J., Song Y., Shao Y., & Zheng S. (2020). Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1). 144.

Zhou Q., Ma K., Hu H., Xing X., Huang X., & Gao H. (2022). Extracellular vesicles: Their functions in plant-pathogen interactions. *Molecular plant pathology*, 23(6). 760–771.

Ziv M., & Altman A. (2003). TISSUE CULTURE | General Principles. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. 1341-1353.

## **Sitografia (consultata al 14/11/23)**

<https://antropocene.it/>