



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Dottorato di Ricerca Internazionale in

“Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare” – XXVIII° ciclo

(Coordinatore: prof. Enzo S.Vicari)

TESI DI DOTTORATO

Studio degli effetti benefici dei “functional foods” *Lycium barbarum e Brassica oleracea* su modelli cellulari ed approcci *in vivo*

Dott. Luca Amodeo

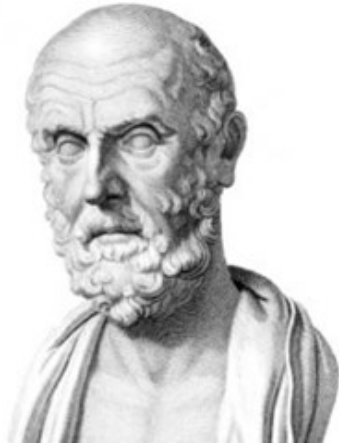
Coordinatore: Chiar.mo Prof. Enzo S.Vicari

Tutor: Chiar.mo Prof. Salvatore Travali

Anno Accademico 2015/2016

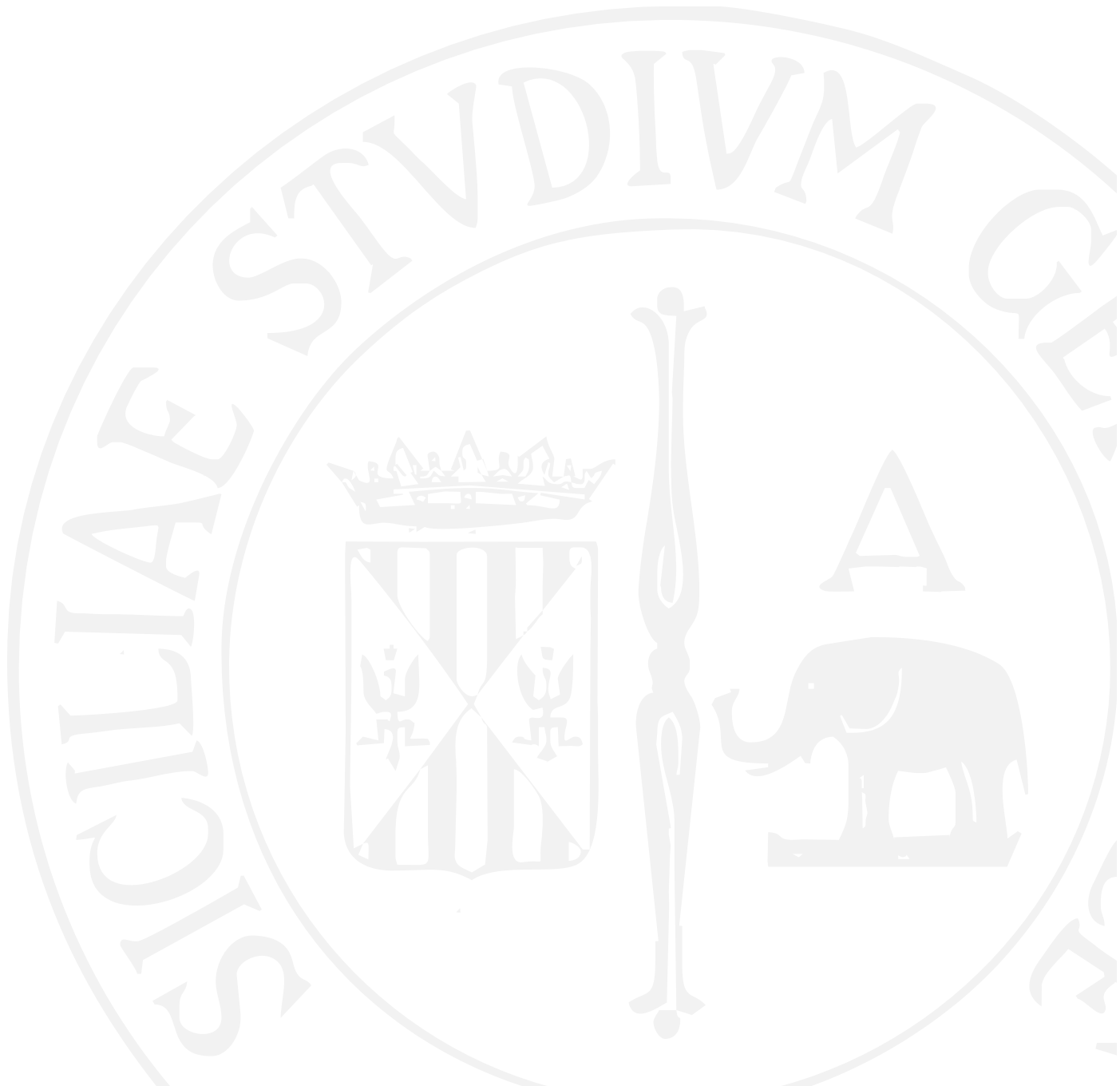
INDICE

Absract	Pag. 1
1. Introduzione	Pag. 3
1.1 Nutrigenomica, Nutraceutica e Nutrigenetica	Pag. 6
1.2 Functional Foods	Pag. 8
2. Scopo del lavoro	Pag. 15
3. Sperimentazione <i>Lycium Barbarum</i>	Pag. 16
3.1 Goji	Pag. 16
3.2 Composizione chimica e proprietà del Goji	Pag. 20
3.3 Infiammazione e Goji	Pag. 23
3.4 Modello cellulare 2D	Pag. 25
3.4.1 La linea cellulare <i>Caco-2</i> come modello <i>in vitro</i> per lo studio dell'assorbimento intestinale	Pag. 26
3.5 Materiale e Metodi	Pag. 26
3.5.1 Preparazione estratto secco bacche di Goji in capsule	Pag. 26
3.5.2 Preparazione succo di bacche di Goji	Pag. 26
3.5.3 Linee cellulari	Pag. 27
3.5.4 Citotossicità : trattamento	Pag. 28
3.5.5 MTT assay	Pag. 28
3.5.6 Modello cellulare 2D	Pag. 30
3.5.7 Integrità del monolayer mediante saggio Rosso-Fenolo	Pag. 32
3.5.8 Analisi molecolare dell'espressione - Estrazione dell'RNA	Pag. 32
3.6 Studio Pilota	Pag. 34
3.6.1 Reclutamento volontari	Pag. 34
3.6.2 Preparazione dell'acqua fecale	Pag. 35
3.6.3 MTT assay su modello 2D	Pag. 36
3.6.4 Microscopia elettronica a Scansione (SEM)	Pag. 37



“ Fà che il cibo sia la tua medicina
e la medicina sia il tuo cibo ”

Ippocrate 460-375 a.C.



ABSTRACT

La conoscenza delle basi biochimiche delle malattie ha indotto a verificare l'ipotesi di poter modulare le funzioni cellulari e potenziare i sistemi di difesa dell'organismo attraverso composti bioattivi presenti negli alimenti naturali, scoprendo e valorizzando la componente funzionale di alimenti che normalmente fanno parte della nostra dieta.

Lo studio di tali attività, in questo lavoro, è stato suddiviso in due linee di ricerca che hanno avuto come oggetto rispettivamente *Lycium barbarum* e *Brassica oleracea*.

La scelta di questi due alimenti è stata effettuata per il ruolo di “super foods” che, sin dall'inizio di questo secolo, hanno rivestito nei paesi occidentali.

Il modello in vivo utilizzato per saggiare la bioattività del Goji, ha previsto in un campione di 20 soggetti, la somministrazione di 15 bacche/die integrate nelle loro abituali diete, per periodi stabiliti (7gg e 15gg) e intervallati da periodi di wash-out.

I risultati hanno mostrato una diminuzione dei livelli di colesterolo e di glucosio dopo integrazione del Goji, livelli che tornavano pressoché ai valori iniziali dopo la sospensione di tale alimento (periodo di wash-out).

L'azione positiva del Goji è stata dimostrata anche dalla diminuzione dell'attività genotossica della Fecal Water, evidenziata da una variazione in termini di riduzione della tossicità dei campioni di FW post integrazione di Goji. Tale risultato ottenuto in vitro potrebbe rispecchiare in vivo una migliore condizione del lume intestinale.

Nella seconda linea di ricerca, per comprendere i meccanismi alla base degli effetti benefici osservati in Brassica oleracea si è voluto indagare sui possibili meccanismi di comunicazione tra mondo vegetale ed animale e, sulla base di recenti lavori in letteratura, focalizzare l'attenzione sulla presenza di microvescicole vegetali che potessero fungere da mezzo di comunicazione in tal senso.

Isolati gli "esosomi" da germinelli di Brassica oleracea ne sono stati saggiati gli effetti in un sistema di colture cellulari tridimensionali (3D) di cellule tumorali, notando un rallentamento della crescita cellulare, che ha suggerito la presenza di un'attività antiproliferativa e citostatica delle microvescicole.

Si pensa che tale attività sia mediata da mirna regolando l'espressione dei geni umani e proteine collaborando con altre componenti di Brassica in un probabile meccanismo di prevenzione del cancro.

L'approfondimento delle proprietà dei composti naturali a livello molecolare e cellulare, ha la potenzialità di permettere di individuare i target farmacologici dei fitocomplessi d'interesse, di valutarne l'attività globale ed aprire una strada per l'identificazione dei biomarker più significativi nella modulazione delle diverse patologie.

1. INTRODUZIONE

Il significato antico che faceva coincidere benessere e salute, riconduceva entrambi i termini ad una condizione di assenza di malattia.

Nel corso degli anni, il mondo scientifico ha avuto modo di rielaborare ed approfondire il concetto definendo la salute come una condizione psicofisica generata da un delicato ed armonico equilibrio di fattori diversi, come già la definì Ippocrate (460-377 a.C.).

La diffusione della cultura di un benessere psicofisico globale si è incentrata sempre più sulla sana alimentazione e sul corretto stile di vita, creando un binomio inscindibile alimentazione-salute, che riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento di tale equilibrio.

L'interesse verso l'alimentazione corretta affonda radici lontane nel tempo; nei testi classici della Medicina Cinese, gli alimenti e i farmaci sono spesso stati considerati derivanti da un'unica fonte [Kojima, 1996]¹. Nel vecchio libro della medicina cinese “*Shinongbochokyung*” venivano consigliati ad uso terapeutico ben 365 tipi di differenti piante, animali e minerali.

I pionieri dell'Arte Medica consideravano l'alimentazione “elemento imprescindibile nella cura della persona”, sintetizzando con un semplice concetto: “*Cura con i farmaci, guarisci con il cibo*”.

Ippocrate, padre della medicina Occidentale, affermava:

“*Fa che il cibo sia la tua medicina...*” invitando così a riflettere sull'importanza dell'alimentazione. Inoltre, nelle sue affermazioni sembrava già sottolineare il ruolo importante dell'alimentazione

personalizzata, ovvero che tenesse conto dei bisogni di ciascuno, diversi e specifici, in base alle proprie abitudini di vita.

Uno studioso francese, J. Seignalet, in un recente testo di nutrizione ha definito la corretta alimentazione “la terza medicina”, intesa come la terza via, rispetto alla medicina tradizionale, in grado di migliorare la qualità della vita e di contribuire a conservare la salute dell’uomo.

Sono numerosi oggi i ricercatori che hanno voluto puntare l’attenzione sul nesso causale che lega gli errori alimentari all’insorgenza di varie malattie, determinando il ruolo essenziale che la dieta svolge nella prevenzione di tali patologie.

Comunemente ed erroneamente si identifica la parola “dieta” con un regime ipocalorico e quindi dimagrante, mentre il termine dieta, che deriva dal greco (δίαιτα), significa “stile di vita” e sta ad indicare l’insieme di alimenti, quindi di nutrienti, che consumiamo per poter vivere.

Le recenti acquisizioni in campo scientifico supportano l’ipotesi che la dieta, oltre a soddisfare il fabbisogno nutrizionale, possa rappresentare una prima linea di difesa, modulare varie funzioni dell’organismo ed essere quindi considerata “funzionale”.

Il concetto di “salubrità” della dieta è assai riduttivo per descrivere la sempre maggiore consapevolezza dei consumatori rispetto allo stretto legame che unisce cibo e salute. Infatti l’attenzione del consumatore è orientata non tanto al fatto che il cibo che mangia sia sano, quanto all’idea che esso possa contribuire al raggiungimento di uno stato di salute ottimale, così come indicato dalle linee guida della World Health Organization, **WHO** (FAO/WHO 1996, USDA 2010).

Il preoccupante incremento di eventi patologici ad alta incidenza, dovuti allo stile di vita sedentario e alla dieta squilibrata, principalmente diffusi nei paesi occidentali, ha favorito la diffusione di questa consapevolezza.

Nel 2003 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), con il documento "Dieta, nutrizione e prevenzione delle malattie croniche" dà atto della centralità del cibo nelle strategie di prevenzione.

Negli ultimi decenni infatti, la richiesta dei consumatori nel campo della produzione alimentare è cambiata considerevolmente. I consumatori sono sempre più interessati ai potenziali benefici degli alimenti e sempre di più credono che il cibo possa contribuire direttamente alla loro salute [*Mollet et al., 2002*]².

Se da un lato infatti la dieta rappresenta uno dei maggiori fattori di rischio per diverse malattie, quali patologie cardiovascolari, infiammatorie, neurodegenerative, malattie dismetaboliche e patologie tumorali, dall'altro un adeguato regime alimentare rappresenta un primo passo verso la prevenzione a tutela della salute [*Slavin 2012*]³.

C'è di fatto una crescente evidenza scientifica che dimostra come modificazioni dietetiche hanno forti effetti, positivi e negativi, sulla salute nell'arco della vita.

Nella maggior parte dei paesi industrializzati il cibo rappresenta oggi qualcosa che va oltre la classica funzione di "carburante energetico" dell'organismo, poiché la scelta del cibo è spesso subordinata a motivazioni socio-culturali, etiche, religiose; questo fenomeno ha portato dunque ad un largo consumo di alimenti in termini quantitativi, a discapito molto spesso della loro qualità.

1.1 NUTRIGENOMICA, NUTRACEUTICA E NUTRIGENETICA

Un innovativo campo di ricerca identificato dalla Nutrigenomica e dalla Nutrigenetica, studia l'interazione tra alimenti e corredo genetico, ovvero l'interazione cibo-DNA. Entrambe le discipline, pur agendo con approcci diversi, hanno il comune obiettivo di migliorare lo stato di salute attraverso la personalizzazione della dieta, e non ultimo l'interesse a comprendere la relazione complessa tra molecole nutritive, polimorfismi genetici e sistema biologico nel suo insieme [*Mutch DM, 2005*]⁴.

L'avvento della genomica funzionale, volta a scoprire le funzioni dei singoli geni e le loro interazioni, integrata con la trascrittomica, proteomica e metabolomica, ha permesso di aumentare la conoscenza di come i nutrienti possono modulare l'espressione genica e proteica e influenzare il metabolismo cellulare [*Izar MCO, 2007*]⁵.

La Nutrigenomica mira a comprendere il modo in cui i nutrienti influiscono sulle vie metaboliche e il controllo omeostatico. Identifica quali sono i comuni alimenti che possono alterare la struttura o l'espressione genica e valuta se e in che modo l'alimentazione può costituire un fattore di rischio per alcuni individui in particolari circostanze. Inoltre afferma che alcuni geni regolati dalla dieta possono avere un ruolo nell'insorgenza, nella progressione e nella gravità di una malattia; osserva anche come il corredo genetico di un individuo può influenzare la misura in cui la dieta influisce sull'equilibrio tra lo stato di salute e di malattia. Allo stesso tempo, questo ramo della medicina, sostiene che le raccomandazioni alimentari basate sulla conoscenza

delle esigenze nutrizionali, lo stato di nutrizione e il genotipo, ovvero un'alimentazione personalizzata, può avere un ruolo chiave per prevenire, alleviare o curare le malattie croniche [Izar MCO, 2007]⁵.

Com'è noto, la variazione genetica è importante per la risposta fisiologica a particolari nutrienti e l'interesse in questo campo continua ad aumentare.

La Nutrigenetica invece, si pone l'obiettivo di capire come il patrimonio genetico di un individuo risponda alla dieta; identifica e caratterizza varianti geniche che determinano una differente risposta ai nutrienti, rapportando tali variazioni allo stato di malattia.

Strettamente correlata alle precedenti, nasce la Nutraceutica, branca della medicina nutrizionale; il termine che la identifica è un neologismo coniato dalla contrazione di "nutrizione e farmaceutica" e studia appunto quell'alimento salutare che associa a componenti nutrizionali le proprietà curative di principi attivi naturali estratti da piante [Kalra EK, 2003]⁶.

In realtà, il termine "nutraceutico" si riferirebbe al singolo composto con proprietà benefiche, mentre "alimento funzionale" alluderebbe piuttosto agli effetti dell'intero alimento [Arai 2008]⁷.

I componenti alimentari hanno proprietà bioattive in diversi tessuti e organi, con effetti sui modelli di espressione genica (trascrittoma), sull'organizzazione della cromatina (epigenoma), sui pattern d'espressione proteica, anche a livello post-trascrizionale (proteoma) e i profili metabolici (metaboloma). Perciò, l'espressione dell'informazione genetica può essere altamente dipendente da, e regolata da, nutrienti, micronutrienti e sostanze fitochimiche che si trovano negli alimenti [Kaput, 2005]⁸.

Oltre ai nutrienti essenziali, come i carboidrati, aminoacidi, acidi grassi, vitamine, esiste una grande varietà di sostanze bioattive non essenziali che sembrano influenzare significativamente la salute dell'organismo [Corth'esy-Theulaz et al 2005]⁹.

Nelle cellule queste molecole possono agire direttamente come ligandi su fattori di trascrizione, essere metabolizzate da vie primarie o secondarie, alterando l'equilibrio quantitativo dei substrati coinvolti nella regolazione genica o nel signaling cellulare; sono inoltre in grado di alterare le vie di trasduzione del segnale.

È importante sottolineare che le sostanze bioattive con effetto benefico non sono nutrienti, cioè non sono essenziali per la vita e si trovano negli alimenti in quantità modeste.

1.2 FUNCTIONAL FOODS

Sono stati provati i potenziali effetti benefici sulla salute dell'uomo di alcune sostanze presenti naturalmente o aggiunte intenzionalmente negli alimenti. Tali risultati sufficientemente convincenti hanno condotto al concetto di alimenti funzionali o "functional foods". Essi rappresentano quindi il punto d'incontro tra ricerca scientifica, innovazione tecnologica e domanda di benessere.

Si definisce Functional Food "un alimento (o parte di esso) che ha effetti positivi per il benessere e la salute, inclusi la prevenzione e il trattamento delle malattie" [Stephan De Felice, 1989].

Il concetto e la terminologia nascono in Giappone [Arai, 2005; Arai, 2013]¹⁰⁻¹¹ negli anni '80 quando, commissionati direttamente dal Ministero di Istruzione, Scienza e Cultura giapponese, cominciarono ad essere sviluppati i progetti nazionali: "Systematic analysis and

development of food functionalities” (1984-1987) e *“Analysis of bodymodulating functions of food”* (1988-1991)¹². Questo dispendioso lavoro di ricerca su scala nazionale fu eseguito da una équipe di scienziati dell’Università di Tokyo coordinata dal professor S. Arai.

Arai prese spunto dagli studi eseguiti dal biochimico U.Suzuki su particolari elementi non nutrizionali noti come “metaboliti secondari”, naturalmente presenti nel cibo, in grado di contrastare l’insorgenza di specifiche malattie. Tali sostanze benefiche vengono prodotte ed immagazzinate nelle cellule vegetali, ma recentemente sono stati scoperti composti analoghi anche nei prodotti di origine animale, ad esempio nel latte.

L’obiettivo di Arai è stato quello di individuare, comprendere e descrivere un unico meccanismo d’azione per quanto riguarda le funzioni fisiologiche di questi elementi non nutrizionali presenti nel cibo. La capacità di tali sostanze di provocare una risposta fisiologica nell’organismo venne denominata appunto “funzionalità”.

Nell’ambizioso progetto, gli scienziati del team individuarono tre diversi tipi di “funzionalità” del cibo: “nutrizionale”, “sensoriale” e “fisiologica”.

La funzionalità nutrizionale, si riferisce alla funzione energetica degli alimenti, svolta dai cosiddetti macronutrienti, cioè lipidi, glucidi e proteine. In particolare, lipidi e glucidi forniscono all’organismo l’energia necessaria per svolgere le funzioni vitali e metaboliche di base e altre attività dispendiose fisiche e mentali; mentre le proteine hanno un ruolo di regolazione di tutti i processi metabolici e sono indispensabili per la crescita ed il rinnovamento cellulare.

La funzionalità sensoriale è un concetto complesso, in cui sono coinvolti diversi sensi (vista, gusto, olfatto e tatto), che riguarda un

insieme di sensazioni percepite dall'individuo quando gli viene presentato un determinato alimento.

Il terzo tipo di funzionalità, ovvero quella fisiologica, descrive le proprietà presenti in alcuni cibi capaci di avere un impatto sulla salute dell'organismo.

Lo studio di Arai fu incentrato proprio su quest'ultimo tipo di funzionalità tanto che oggi quando si parla di "funzionalità del cibo" ci si riferisce esclusivamente a quella fisiologica

Una volta identificate nelle materie prime alimentari le sostanze fisiologicamente attive, il passo successivo nello studio giapponese fu quello di mettere a punto tecniche che avrebbero permesso di "arricchire" con tali effetti benefici quei cibi scarsamente funzionali, aumentandone il valore salutistico.

Così furono progettati i primi Functional Food.

L'eco del progetto di Arai ebbe ripercussioni determinanti sulla politica del Paese, tanto che nel 1991 il Ministero della Salute e del Welfare giapponese acconsentì alla commercializzazione di un selezionato gruppo di functional foods denominati "Foods for specified health use" (FOSHU). Ad oggi, il Ministero giapponese ha approvato circa un migliaio di diversi prodotti cosiddetti FOSHU, conosciuti e commercializzati in 10 categorie di "health claim", indicazioni salutistiche, ognuna delle quali comprovate da indagini scientifiche su popolazione (in vivo).

Negli USA, a partire dal 1993, sono stati ammessi su alcuni alimenti i claims relativi alla "riduzione del rischio di malattia", autorizzati dalla Food and Drug Administration (FDA), sulla base di evidenze scientifiche pubbliche.

In Europa, nel 1995 il Ministero dell'Agricoltura inglese apre il mercato ai functional food, ovvero i prodotti alimentari commercializzati in Europa che corrispondono per caratteristiche e funzionalità ai FOSHU giapponesi.

In seguito al crescente interesse per il concetto di alimenti funzionali e per gli health claims, l'Unione Europea ha realizzato una Azione Concertata della Commissione Europea sulla Functional Food Science in Europe (FUFOSE).

Il progetto FUFOSE ha preso in esame sei aree scientifiche e salutistiche: crescita, sviluppo e differenziazione cellulare, metabolismo basale, difese dai composti ossidanti, alimenti funzionali e sistema cardiovascolare, fisiologia e funzionalità gastrointestinale ed effetti degli alimenti sul comportamento e sul profilo psicologico. Il documento finale, pubblicato sul British Journal of Nutrition, sottolinea come gli alimenti funzionali debbano comunque restare «alimenti», come tradizionalmente li conosciamo, e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta.

L'Azione Concertata FUFOSE ha indicato fondamentalmente due tipi di health claim per gli alimenti funzionali, ovvero:

1. claim correlati al miglioramento di una funzione biologica, per i quali si richiede una verifica dell'efficacia degli effetti funzionali basata su parametri validati, che dimostrino il miglioramento di una specifica funzione biologica.

2. claim correlati alla riduzione del "rischio di malattia", dove si richiede una verifica dell'efficacia fondata su indicatori in grado di rilevare i punti critici legati alle fasi di sviluppo (cioè all'insorgenza) di

una malattia, oppure, ove possibile, della malattia stessa [Corbellini, 2012]¹³.

Poiché le conclusioni e i principi del progetto FUFLOSE devono essere ancora implementati, è stato avviato un nuovo programma di Azione Concertata della Commissione Europea, il progetto *Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods* (PASSCLAIM), che si prefigge l'obiettivo di risolvere alcuni degli attuali problemi relativi alla validazione, alla conferma scientifica dei claims e alla comunicazione al consumatore.

Il progetto PASSCLAIM ha proprio l'obiettivo di stabilire criteri comuni per valutare la fondatezza scientifica degli health claims, fornendo un quadro normativo per la preparazione di dossier scientifici a sostegno di tali claims.

In ogni caso, con l'eccezione del Giappone, non esiste una normativa specificamente dedicata ai functional food, del resto non esiste neppure una definizione ufficiale ed universalmente riconosciuta del termine. Per questo motivo, le normative nazionali sono attualmente in fase di revisione.

L'*Institute of Medicine della US National Academy of Sciences* definisce i functional food come “cibi in cui le concentrazioni di uno o più ingredienti sono state manipolate o modificate per migliorare il loro contributo ad una dieta salutare”.

La verifica dell'effettiva veridicità degli effetti salutistici attribuiti ai cibi funzionali è un compito alquanto arduo: come già accennato, la legislazione in ambito di functional food è tuttora in fase di “costruzione” e questo perché non esiste ancora una definizione legale vera e propria [Togni, 2011]¹⁴.

Generalmente un alimento funzionale deve:

- Essere un normale alimento quotidiano consumato nell'ambito di una normale dieta.
- Essere composto da ingredienti che fanno normalmente parte del prodotto, anche in concentrazioni aumentate, oppure da ingredienti aggiunti che normalmente non rientrano nella composizione del prodotto stesso.
- Avere un effetto positivo su funzioni mirate, oltre al classico effetto nutritivo.
- Avere potenzialmente la capacità di migliorare lo stato di salute generale e/o ridurre il rischio di una malattia; oppure di fornire un beneficio alla salute in termini di miglioramento della qualità della vita per ciò che riguarda funzioni fisiche, psicologiche o comportamentali.
- Presentare messaggi salutistici (health claim) autorizzati e scientificamente comprovati.

Le proprietà che rendono l'alimento "funzionale" sono quindi dovute a composti:

- ✓ naturalmente presenti nell'alimento (alimenti funzionali naturali)
- ✓ presenti nell'alimento, ma arricchiti (alimenti funzionali arricchiti)
- ✓ non presenti naturalmente nell'alimento, ma aggiunti, eliminati o modificati (ad esempio, per migliorare la biodisponibilità).

Caratteristica tipica dei composti bioattivi è anche quella di trovarsi negli alimenti in quantità modeste.

I composti vegetali bioattivi sono presenti in frutta, verdura, cereali e altri alimenti vegetali e contengono diversi composti che, in base alla loro composizione chimica, possono essere classificati in carotenoidi, fenoli, alcaloidi e contenenti azoto e composti organo-zolfo.

I composti fenolici, i flavonoidi e i fitoestrogeni hanno suscitato particolare interesse a causa dei loro potenziali effetti come composti antiossidanti, antiestrogenici, anti-infiammatori, immunomodulatori, chemiopreventivi e anticarcinogeni.

Esistono inoltre sostanze che rientrano nei prodotti “funzionali” per la loro bioattività nell’ostacolare la crescita dei batteri patogeni, favorendo il mantenimento dell’omeostasi nell’ecosistema intestinale. Tali sostanze sono i “probiotici” e i “prebiotici” che esplicano un’azione protettiva nei confronti dell’intestino attraverso molti meccanismi: ad esempio la riduzione del pH nel lume intestinale, l’influenza sulla risposta immunitaria dell’ospite, l’inattivazione di sostanze potenzialmente cancerogene e la riduzione di alcune attività enzimatiche coinvolte nello sviluppo tumorale.

I bersagli su cui l’alimento funzionale esplica la propria azione, al fine di produrre effetti benefici sono eterogenei e molteplici:

- generale mantenimento della salute (ad esempio la funzione immunitaria, la salute mentale, la salute durante l’invecchiamento, l’omeostasi delle funzioni intestinali)
- migliore sviluppo ed accrescimento
- riduzione del rischio di obesità
- riduzione del rischio di patologie cronico-degenerative (come malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, malattie metaboliche e malattie muscolo-scheletriche).

2. SCOPO DEL LAVORO

Alla luce delle evidenze scientifiche, tra gli alimenti funzionali ho scelto di studiare il *Lycium barbarum* e la *Brassica oleracea*, valutandone gli effetti attraverso studi sia *in vitro* che *in vivo*, in due linee di ricerca parallele.

In particolare, il *Lycium*, pur essendo un alimento noto sin dall'antichità, ha trovato ampio spazio recentemente tra gli studi della comunità scientifica internazionale che ne ha messo in evidenza i suoi effetti benefici sulla salute, ed è balzato agli occhi dei consumatori attratti proprio dalle numerose proprietà attribuitegli.

La Brassica invece, rappresenta un elemento fondamentale della nostra Dieta Mediterranea, che si compone di abbondanti alimenti di origine vegetale (frutta, verdura, ortaggi, pane e cereali) freschi, al naturale, di stagione e di origine locale, di cui sono ben noti gli effetti benefici.

In realtà l'interesse maggiore è stato quello di testare questi fitocomplessi attraverso approcci sperimentali innovativi, quali i modelli cellulari 2D e 3D. Seppur noti gli effetti benefici, meno noti rimangono i meccanismi con cui si esplicano; a tal proposito si è voluto indagare sulla presenza di microvescicole vegetali (“esosomi”), probabili attori del meccanismo di comunicazione intercellulare.

Lo scopo del seguente lavoro è stato dunque quello di verificare le attività dei fitocomplessi contenuti in alcuni Functional Foods, presenti nella dieta.

3. SPERIMENTAZIONE *LYCIUM BARBARUM*

3.1 GOJI

Le Bacche di Goji sono i frutti di un arbusto appartenente alla famiglia delle Solanaceae di cui fanno parte anche pomodoro, melanzana, tabacco e peperoncino.

Quando si parla delle bacche di Goji ci si riferisce solitamente al frutto della specie *Lycium barbarum* il cui habitat di origine è situato negli altipiani himalayani del continente asiatico. Cresce a circa 1500 mt di altitudine, in zone caratterizzate da elevate escursioni termiche e su terreni bagnati da Fiume Giallo, particolarmente ricco di sali minerali. La pianta del Goji si presenta come un arbusto in grado di raggiungere i tre metri di altezza, che produce fiori di color lavanda o violetto. Le bacche sono delicati frutti di colore rosso che maturano da agosto ad ottobre, con diametro di 1-2 centimetri, contenenti sino ad una sessantina di piccoli semini gialli.

Oltre al *Lycium barbarum* esistono altre varietà di *Lycium* da cui è possibile raccogliere questi frutti come ad esempio il *Lycium chinense*. La pianta, oggi, è largamente distribuita nelle regioni calde del mondo, in particolare nell'area mediterranea ed in Asia Centrale; il *L. chinense* è maggiormente diffuso nel sud della Cina, in Corea ed in Giappone.

La maggior parte delle bacche prodotte commercialmente deriva dalle piantagioni del *L. barbarum* nella Cina nord-centrale.



Figura 1: Lycium Barbarum - Goji

Il *L. barbarum* oltre ad essere la specie più diffusa, è anche quella che merita più attenzione per la quantità di ricerche scientifiche orientate a dimostrarne i benefici.

Esiste una leggenda riguardante il Goji e le sue bacche, veri e propri elisir di giovinezza dalle proprietà considerate quasi magiche.

Ecco come il poeta cinese *Liu Yuxi* (772-842 d.C), nella sua poesia “Il Pozzo della Giovinezza”, descrive le straordinarie proprietà del Goji:

“Un pozzo d’acqua fresca si trova dietro il tempio dei monaci, una sorgente cristallina alimenta il pozzo e l’acqua possiede grandi poteri, foglie verde smeraldo crescono lungo il bordo, le bacche color rosso intenso brillano come rame, i rami vigorosi come un bastone da passeggio, la vecchia radice dalla forma di cane auspica buona fortuna, il Goji nutre il corpo e lo spirito, bevi dal pozzo e godi di una lunga vita.”

Le popolazioni asiatiche conoscono da millenni gli effetti benefici sulla salute delle bacche di Goji, che sono ampiamente

coltivate e consumate come alimento. Questo frutto è considerato un caposaldo nell'ambito della medicina tradizionale cinese, dove trova impiego come cura per molti disturbi della salute; infatti nei trattati di medicina, antichi e moderni, sono moltissimi i riferimenti a queste bacche. Hanno rivestito un ruolo importante, sin dai tempi più remoti, nella medicina cinese come ingrediente principale in rimedi naturali, specialmente nel trattamento di malattie epatiche croniche, diabete, tubercolosi, malattie oculari, rash cutanei, psoriasi, disordine renale, bilanciando quello che viene definito nella loro cultura lo “Yin and Yang” del corpo, ovvero la perpetua compenetrazione e fusione degli opposti complementari. La medicina cinese fa anche uso delle radici di questa pianta, per la preparazione di decotti contro l'insonnia, contro l'emottisi, l'ematuria e nel trattamento dell'ipertensione [Zhufan et al., 2000; Bensky et al., 2004]¹⁵⁻¹⁶.

Nel Regno Unito e nel nord America le bacche vengono utilizzate come integratore alimentare nella dieta per rafforzare le difese immunitarie.

Il frutto di Goji, *Lycium Barbarum*, è stato inserito dal *Ministero della Salute Italiano* nell'elenco ufficiale degli estratti vegetali impiegabili come integratore “antiossidante” (*decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169*) e la Commissione Europea per la vigilanza sulla sicurezza alimentare ne ha definito sicuro il consumo come ingrediente alimentare.

L'impiego delle bacche di Goji in alcune tradizioni mediche ha portato allo sviluppo di ricerche su quelli che potrebbero essere i suoi composti bioattivi.

Le bacche di Goji forniscono un buon apporto di macromolecole come carboidrati (46%), proteine (13%), grassi (1,5%) e fibre (16%) e contengono micronutrienti come vitamine e minerali.

Oltre ai componenti sopra elencati, contengono riboflavina, tiamina, acido nicotinico e ben 21 tracce di minerali, incluso il germanio, un elemento chimico dimostrato efficace contro le malattie cellulari e che raramente si trova in altri cibi naturali [Li et al., 2001]¹⁷.

Si è calcolato che 100 g di bacche di Goji contengono fino a 60 mg di calcio; 5,4 mg di ferro; 434 mg di potassio; 1,48 mg di zinco e 48 mg di vitamina C (*Centre for Food Safety Nutrient, 2011*).

Le bacche del Goji vengono considerate tra le fonti di cibo naturale più ricche di antiossidanti esistenti sulla Terra. Il loro potere antiossidante raggiunge vette sorprendenti utilizzando il valore di misurazione **ORAC** (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), scala di misurazione che prende in considerazione per gli alimenti la capacità di assorbimento dei radicali dell'ossigeno, indicando il maggior potere antiossidante dell'alimento in base al maggior punteggio ORAC raggiunto. La capacità antiossidante attribuita alle bacche di Goji è indicata con un il valore di 25.000/30.000 (il melograno ad esempio raggiunge il valore di 11.000, il mirtillo di 3.750, il cioccolato fondente di 13.200 e il lampone nero il tasso di 7700, le arance di 1.475).



Figura 2 - Tabella ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Gli antiossidanti sono sostanze efficaci nel prevenire gli effetti dannosi indotti dai radicali liberi nell'organismo. Grazie al ruolo di "scavenger" di radicali liberi, queste sostanze sono in grado di ridurre, almeno in parte, i fenomeni di ossidazione che avvengono a carico delle macromolecole presenti nell'organismo (proteine, DNA e lipidi) contribuendo così alla funzionalità di membrana ed evitando la formazione di composti tossici per la cellula stessa.

3.2 Composizione chimica e proprietà del Goji:

Le proprietà antiossidanti del *Lycium barbarum* sono da attribuire ai suoi componenti attivi quali: polifenoli, polisaccaridi e carotenoidi (β - carotene, β - criptoxantina, licopene , zeaxantina [Wang et al., 2010]¹⁸.

Negli alimenti di origine vegetale sono presenti più di 5.000 polifenoli, la maggior parte dei quali è rappresentata dai flavonoidi che comprendono flavanoli, flavonoli, flavoni, flavanoni, isoflavoni, antocianine [Pan et al., 2010]¹⁹.

L'attività antiossidante dei polifenoli è legata alla loro struttura (Fig. 3) ed al potenziale di riduzione e dipende dal pattern di idrossilazione, cioè dal numero, dalla specifica posizione e dalla sostituzione di specifici gruppi idrossilici che differenziano i singoli composti.

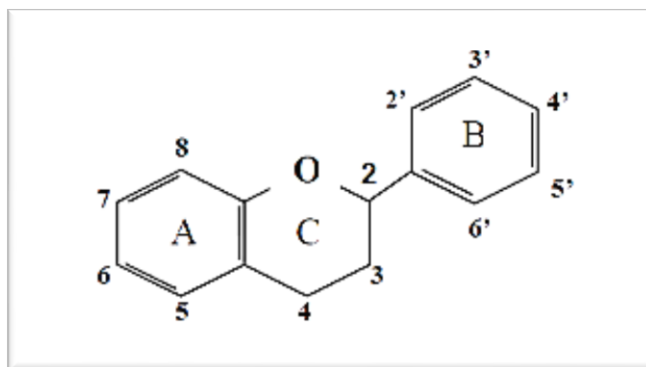


Figura 3 - Struttura chimica polifenoli

I polifenoli hanno un potenziale di riduzione medio nella scala degli antiossidanti naturali, paragonabile a quello della vitamina E, ma più elevato di quello dell'acido ascorbico, considerato il migliore antiossidante naturale [Pietraforte et al., 2005]²⁰. Il consumo di cibi come frutta e verdura e bevande ricchi in antiossidanti è stato spesso associato ad una diminuzione del rischio di insorgenza di malattie neurodegenerative e cardiovascolari [Van't Veer et al., 2000]²¹.

Negli ultimi anni, i polisaccaridi isolati da estratti acquosi del *L. barbarum* (LBP) sono stati identificati come i principali ingredienti attivi responsabili di molte attività biologiche.

A tal proposito gli effetti sulla salute del LBP sono stati riportati in vari studi nei quali si è visto che LBP possiede diverse attività biologiche che includono: funzioni antiossidanti, anti-invecchiamento,

antitumorale, antidiabetico, citoprotettivo, neuroprotettivo ed effetti di immunomodulazione.

Si ritiene che i polisaccaridi sono i composti attivi ed i principali responsabili dei vari effetti benefici del *Lycium barbarum*. Sono stati isolati e purificati da estratti acquosi del frutto, attraverso la cromatografia a scambio ionico con resina in cellulosa e gel cromatografia, ed è stata determinata la componente monosaccaridica dell'intera frazione polisaccaridica tramite gas cromatografia, eseguita dopo aver effettuato l'idrolisi delle proteine [Luo et al., 2000]²².

Tale componente prevede la presenza di 6 diversi monosaccaridi: ramnosio, galattosio, glucosio, arabinosio, mannosio e xilosio [Wang et al., 2009; Li et al., 2007]²³⁻²⁴.

LBP può inoltre bilanciare lo stress ossidativo attraverso l'eliminazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) come nel caso dei radicali liberi promuovendo i fattori antiossidanti endogeni come il superossido dismutasi (SOD), glutatione perossidasi (GSH-Px) e catalasi (CAT).

In aggiunta alla loro attività antiossidante, le bacche di Goji possono anche spiegare un effetto epato-protettivo e quindi un miglioramento della possibilità di sopravvivenza delle cellule epatiche attraverso meccanismi come la regolazione dell'espressione del citocromo P450 e l'inibizione dell'apoptosi.

Alcuni ricercatori hanno inoltre dimostrato che LBP esercita un effetto stimolante sull'apoptosi nelle cellule di carcinoma mammario umano (MCF7) e induce l'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 o S attraverso la produzione di ROS e il danneggiamento del DNA.

Mao et al. [Mao et al.]²⁵ hanno dimostrato su cellule di cancro al colon (Caco-2) che l'effetto antitumorigenico dell'LBP potrebbe

derivare dall'arresto in fase G0/G1 del ciclo cellulare attraverso i cambiamenti nelle proteine associate al ciclo cellulare, come alcune cicline.

Ulteriore classe di sostanze contenute nelle bacche di Goji è rappresentato dai carotenoidi, isoprenoidi con 40 atomi di carbonio, presenti diffusamente nelle piante e nei frutti con pigmenti liposolubili rossi, gialli ed arancioni. Appartengono a questo gruppo i caroteni, le xantofille, il licopene, la luteina e le xantine.

Oltre al loro usuale utilizzo come coloranti non tossici nell'industria alimentare e nella cosmetica, possiedono proprietà antiossidanti ed anti-infiammatorie. Il contenuto totale di carotenoidi nelle bacche di Goji è compreso tra lo 0,03 e lo 0,5% ed è variabile durante le stagioni, infatti aumenta durante la maturazione del frutto [*Piao et al., 2005*]²⁶.

La zeaxantina dipalmitato è il principale componente e rappresenta il 56% del contenuto totale dei carotenoidi [*Weller et al., 2003*]²⁷.

3.3 Infiammazione e Goji

Negli ultimi anni sono stati intensamente studiati i meccanismi molecolari dell'infiammazione cronica, la sua prevenzione e la sua attenuazione, mediante il consumo di cibi naturali. L'interazione alimenti-flora batterica-intestino è alla base di molteplici fenomeni che influenzano lo stato di salute o di malattia. L'infiammazione è un processo complesso con cause multifattoriali, dall'infezione batterica all'inquinamento ambientale, che si traducono in un danno cellulare o nella morte stessa [*Iwalewa et al. 2007*]²⁸.

I danni che la dieta comporta sono dovuti alla incapacità del genoma umano di adattarsi ai rapidi cambiamenti dell'ambiente, in particolare della dieta stessa [Willett, 2002]²⁹.

La dieta esplica i suoi effetti sull'infiammazione tissutale sia per azione diretta sulle cellule, sia perché regola la composizione della flora intestinale (microbiota intestinale). A sua volta il microbiota, attraverso la sua composizione e per mezzo dei prodotti del metabolismo batterico, influenza la risposta metabolica, immune ed infiammatoria dell'organismo [Maslowski et al., 2011]³⁰.

Questo campo di ricerca è in fase di pieno sviluppo come suggerisce uno studio pubblicato recentemente in cui si dimostra che il microbiota intestinale modula le anomalie comportamentali e fisiologiche associate a disturbi dello sviluppo neurologico [Hsiao EY et al 2013]³¹.

Studi epidemiologici suggeriscono che la minore incidenza di alcune patologie croniche come aterosclerosi, artrite, diabete, neoplasie e patologie neurodegenerative e cardiovascolari è associata ad una costante assunzione di frutta ed ortaggi [Chu et al., 2002]³².

Studi su animali hanno mostrato che diverse sostanze che si trovano naturalmente in alcuni alimenti oltre ad avere proprietà antiossidanti, hanno anche manifestato un'attività anti-infiammatoria [Weisburger, 2002]³³.

Tra gli effetti biologici attribuiti al *Lycium barbarum* vi è dunque un'azione protettiva che interferisce con il processo infiammatorio. Tale proprietà è data da fitoestrogeni, flavonoidi, tocoferolo, acido ascorbico, curcumina, tutte sostanze in grado di inibire i target molecolari dei mediatori pro-infiammatori, di rimuovere o neutralizzare i fattori che promuovono l'infiammazione.

3.4 Modello cellulare 2D

3.4.1 La linea cellulare Caco-2 come modello in vitro per lo studio dell'assorbimento intestinale

Il modello di assorbimento intestinale basato sulle cellule Caco-2 (ATCC® HTB-37™), isolate da un adenocarcinoma colon-rettale umano, è un sistema in vitro ben caratterizzato che rende possibile studiare la tossicità di tutte quelle sostanze che vengono ingerite intenzionalmente o accidentalmente definire il loro meccanismo di trasporto attraverso la barriera intestinale, e quindi determinare la biodisponibilità delle stesse nel sangue e nei tessuti.

Nel 1974 *Jorgen Fogh* utilizzò un modello cellulare di Caco-2 ed in pochi anni divenne un modello cellulare in vitro accettato per lo studio della permeabilità dei farmaci.

Per composti somministrati oralmente, la permeabilità attraverso il monolayer formato dalle Caco-2 mostrò una buona correlazione con l'assorbimento in vivo nell'uomo. Questo modello cellulare permette di studiare i principali meccanismi di trasporto, di assorbimento mediato dai trasportatori e di efflusso dei farmaci. Il modello di assorbimento in vitro è accessibile ed altamente riproducibile ed è anche usato per analisi di tossicità, come nel campo dell'agribusiness [*Shah et al., 2006*]³⁴.

Il modello intestinale con le Caco-2 è l'oggetto di un elevato numero di pubblicazioni in ambito farmaceutico che ad oggi ne giustifica la validità scientifica e lo promuove come modello biologico di riferimento per lo studio dell'assorbimento intestinale in vitro.

3.5 Materiali e Metodi

3.5.1 Preparazione estratto secco di bacche di Goji in capsule

Le capsule di Goji (Erbaviva 363,2 mg per capsula), titolate al 50% di polisaccaridi, inulina, antiagglomeranti, magnesio stearato vegetale sono state solubilizzate in terreno di coltura (RPMI); la soluzione (36.3mg/ml) è stata successivamente filtrata mediante filtri aventi pori con diametro pari a 0.22 μm .



Figura 4 : Capsule Goji (Erbaviva)

3.5.2 Preparazione succo di bacche di Goji.

400gr di bacche secche (GOXY - Bacche di Goji disidratate PRIMA SCELTA - GREEN QUALITY) sono state reidratate in ddH₂O. Il succo, ottenuto mediante Slow Juicer (HURON), è stato inizialmente centrifugato a 3000rpm per 15 minuti e successivamente a 10000 rpm per 10 minuti. La fase liquida recuperata è stata filtrata con filtri 0.45 μm e 0.22 μm e conservate a -80° fino al suo utilizzo.

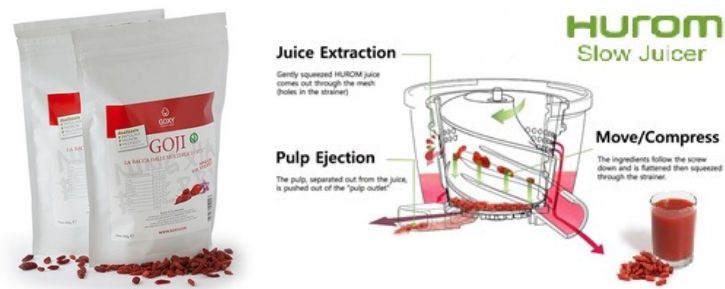


Figura 5 : Succo di bacche di Goji

3.5.3 Linee cellulari

Per gli esperimenti sono state utilizzate le seguenti linee cellulari: A375 (ATCC[®] CRL-1619[™]) (cellule di melanoma maligno); HT-29 (ATCC[®] HTB-38[™]) (cellule di adenocarcinoma colon-rettale); DU145 (ATCC[®] HTB-81[™]) (cellule di carcinoma alla prostata) , acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC)

Il terreno di crescita specifico per le A375, le HT29 e le DU145 è costituito da RPMI 1640 (Sigma Aldrich) arricchito con 10% di siero fetale (FBS) (Sigma Aldrich), 1% di L-glutammina (50U/ml) (Sigma Aldrich) e 1% di streptomicina/penicillina (50U/ml) (Sigma Aldrich). Le linee cellulari sono state mantenute in coltura (Thermo Scientific, modello HERAcell150i) in condizioni di atmosfera standard ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO₂.

3.5.4 Citotossicità: trattamento

Le linee cellulari sono state piastrate alla densità di 3×10^3 cells/well in piastre da 96 wells in un volume finale di 200 μ l. Dopo 24h, ciascuna linea cellulare è stata trattata a differenti concentrazioni di succo (0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 10%) ed a differenti concentrazioni di estratto (0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml, 8mg/ml, 16mg/ml) di bacche di Goji per la valutazione della vitalità cellulare mediante MTT assay a 24h, 48h e 72h di incubazione. Come controllo negativo sono state utilizzate le stesse linee cellulari in presenza di solo terreno di coltura. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

Concentrazioni trattamento Goji							
Conc. estratto	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml	8 mg/ml	16 mg/ml
Conc. succo	0,01%	0,05%	0,1%	0,25%	0,5%	1%	10%

Figura 6 : Concentrazione di estratto e succo di Goji

3.5.5 MTT assay

Il saggio del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) è un saggio colorimetrico ampiamente utilizzato, che permette di misurare la proliferazione e la vitalità cellulare attraverso la valutazione dell'efficienza mitocondriale. Il bromuro di tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-fenil)-2,5-difenile (figura 1) è un sale

di tetrazolio (di colore giallo) che nelle cellule vitali è ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali.

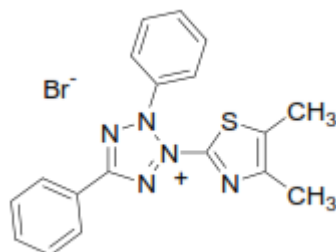


Figura 7 - Struttura del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Questo composto presenta un anello tetrazolico che può essere facilmente ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali o da altri sistemi di trasporto elettronico, formando, per apertura dell'anello tetrazolico, un composto cromogeno azotato detto formazano.

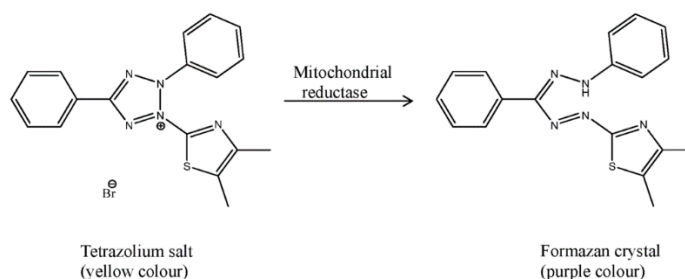


Figura 8 : Riduzione del Bromuro di 3-(4,5-DIMETILTIAZOL-2-IL)-2,5-DIFENILTETRAZOLIO (MTT) in Formazano

La riduzione determina pertanto la formazione di cristalli di formazano, che attribuiscono una caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali.

La trasformazione dell'MTT determina, infatti, un viraggio della molecola da giallo a blu-violetto.

Questa reazione avviene solo nelle cellule vive e non in quelle morte o danneggiate, e pertanto in cellule non proliferanti la colorazione risulterà meno intensa.

L'intensità del colore, proporzionale alla quantità di formazano formato, è indice di sopravvivenza ed è stata analizzata mediante la lettura colorimetrica alla lunghezza d'onda di 550 nm (test filter). Il valore di OD ottenuto a 550 nm, è stato aggiustato mediante la sottrazione del valore OD ottenuto a 630 nm (reference filter).

La sopravvivenza cellulare è stata espressa sia come percentuale rispetto al controllo non trattato, sia come valori assoluti di assorbanza dei campioni trattati e campioni controllo.

3.5.6 Modello cellulare 2D

Gli inserti MILLICELL-HA (membrana di policarbonato, dimensione dei pori 0,45 μm , diametro 10 mm, Millipore) sono stati posti in piastre da 24 wells.

Su ogni inserto sono state piastrate 5×10^4 cellule Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™) per cm^2 ; sono stati aggiunti 200 μl di terreno di coltura (EMEM) nel lato luminale/apicale (AP) e 900 μl di medium nel lato baso-laterale (BL). Le cellule, sono state fatte crescere per 21gg sostituendo il terreno di crescita ogni 3gg. Al termine di questo periodo, l'EMEM è stato rimosso e le cellule sono state lavate con PBS. Accertata l'integrità dei monolayers, mediante saggio con rosso-fenolo, sono stati effettuati i trattamenti secondo lo schema seguente:

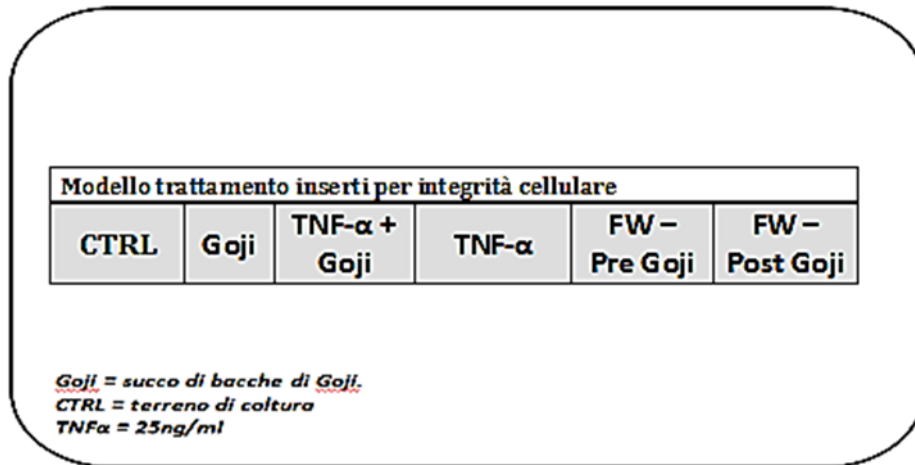


Figura 9 : Modello trattamento inserti per integrità cellulare

I tempi di incubazione sono stati di : 1h, 3h, 6h, 12h allo scadere dei quali si è proceduto alla valutazione dell'integrità del monolayer mediante saggio con rosso-fenolo.

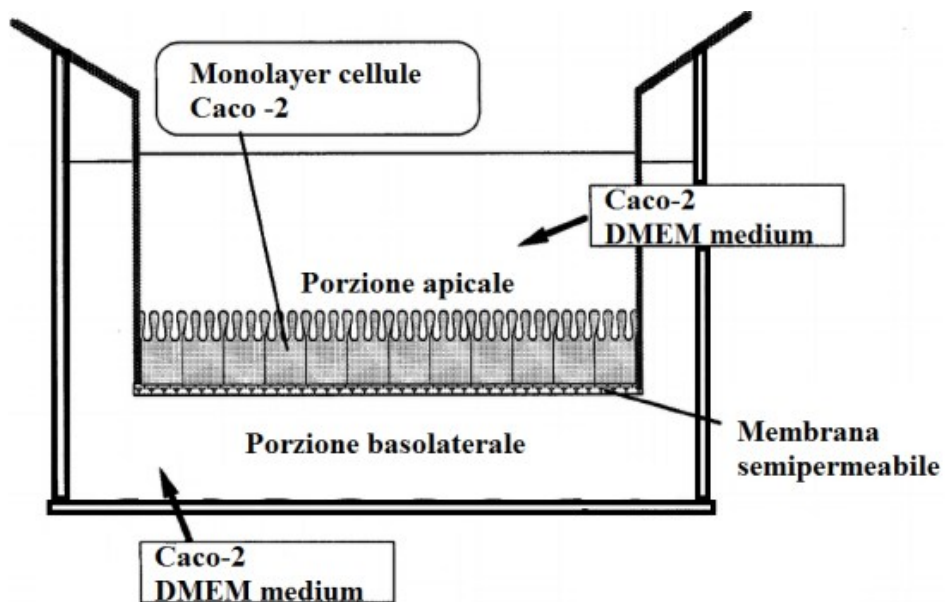


Figura 10 : Modello cellulare 2D

3.5.7 Integrità del monolayer mediante saggio con rosso-fenolo

L'integrità cellulare del monolayer è stata valutata mediante il saggio di permeabilità al rosso-fenolo. Rimosso il terreno di coltura sia dalla parte apicale che basale dell'inserto, è stato effettuato un lavaggio in PBS; di seguito sono stati aggiunti 200µl di PBS + rosso fenolo (500µM) nella parte apicale e 900µl di solo PBS nella parte basale, posti in incubazione a 37°C per 2h al termine del quale si è proceduto con la valutazione della quantità di rosso fenolo permeato nella zona basale mediante lettura spettrofotometrica (492nm).

3.5.8 Analisi molecolare dell'espressione

Estrazione dell'RNA

L'espressione del gene Cox-2, coinvolto nei processi di infiammazione, è stata valutata tramite RT-PCR.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando PureLink RNA Mini Kit (Ambion) ed il dosaggio dei campioni è stato eseguito mediante lettura allo spettrofotometro NanoDrop 1000 alla lunghezza d'onda di 260 nm.

L'RNA totale (1µg) è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). I primers utilizzati per le successive amplificazioni sono riportati in tabella 1.

PGK1-FW	TTAAAGGGAAGCGGGTCGTT
PGK1-RW	CAGGCATGGGCACACCAT
COX2-FW	CAGCACTTCACGCATCAGTT
COX2-RW	AGACCAGGCACCAGACCAA

Tabella 1: Sequenza primers GK1 - COX2

Come gene endogeno è stato utilizzato il gene PGKI.

<i>RT-PCR</i>	
MoMuLV reverse transcriptase buffer 5x	4 μ l
Random primers	3 μ l
dNTPs mix	2 μ l
DTT 0,1 M	2 μ l
MoMuLV reverse transcriptase 100U/ μ l	1 μ l
RNA 200 ng/ μ l	5 μ l
H2O-DEPC	3 μ l

Tabella 2 : Protocollo RT-PCR

I prodotti di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1% in TBE 1X.

3.6 Studio pilota

3.6.1 Reclutamento volontari

Per questo studio sono stati reclutati, dopo consenso informato, 20 volontari in buono stato di salute. I criteri di esclusione seguiti sono stati:

- ✓ l'assunzione di farmaci,
- ✓ la restrizione calorica,
- ✓ l'assunzione giornaliera di pre- e pro-biotici o integratori
- ✓ soggetti con qualsiasi disturbo gastrointestinale.

I volontari hanno compilato un questionario per capire le loro abitudini alimentari e a loro è stato chiesto di integrare nella loro abituale dieta circa 15 bacche di Goji (Fig. 11)



Figura 11 : Bacche di Goji (*Lycium barbarum*)

Lo studio è stato condotto in quattro fasi: fase A (7 gg di trattamento) e fase B (7 gg di wash-out), fase C (15 gg di trattamento) e fase D (15 gg di wash-out).



Figura 12: Schema Studio Pilota - integrazione bacche di Goji

I soggetti sono stati sottoposti ad analisi del sangue nelle varie fasi dello studio al fine di valutare eventuali variazioni dei parametri chimico-clinici ed ematologici:

- parametri infiammatori (PCR, VES, Reuma Test);
- funzionalità epatica (GOT, GPT);
- parametri emocromocitometrici;
- citofluorimetria di flusso (assetto leucocitario);
- valori ematici fisiologici (glicemia, colesterolemia, trigliceridi).

Inoltre, ad ogni volontario è stato incaricato di raccogliere l'intero campione di feci e di mantenerlo refrigerato.

Aliquote di feci sono state immediatamente processate per la preparazione dell'acqua fecale e conservate a -80°C .

3.6.2 Preparazione dell'Acqua Fecale

Negli ultimi anni, l'interesse dei ricercatori si è concentrato sulla fase acquosa delle feci umane (FW) per studiarne la relazione con i

componenti della dieta, dato che l'FW interagisce più facilmente con l'epitelio del colon rispetto alla fase solida e riflette il contenuto luminale di fattori di rischio e fattori protettivi. E' un prodotto bioattivo altamente variabile, in grado di suscitare vari effetti cellulari, tra cui danni al DNA e citotossicità, questa bioattività è soggetta a modifiche attraverso la dieta. La variabilità dei dati di genotossicità inter-intra personale è dovuta, presumibilmente, a differenze nella dieta e nella composizione del microbiota intestinale.

Per la preparazione dell'acqua fecale (FW) sono stati prelevati 15g dall'intero campione di feci, opportunamente diluiti 1:1 con terreno di coltura ed omogenizzati mediante Stomacher . L'omogenato è stato centrifugato a 50000g per 120 min a 10°C; il surnatante di ogni campione è stato accuratamente recuperato, filtrato inizialmente attraverso filtri con pori di 0,45µm e successivamente con filtri di 0,22µm. Infine, l'acqua fecale ottenuta è stata aliquotata e conservata a -80°C, fino a successive analisi.

3.6.3 MTT assay su modello 2D

La linea cellulare CaCo2 è stata trattata con : TNF- α (25ng/ml), estratto di bacche di Goji(1%) , TNF- α + Goji , FW pre-Goji(8%) e FWpost-Goji(8%); la vitalità cellulare è stata valutata dopo 24h di incubazione. I risultati ottenuti sono stati rapportati ai relativi CTRL, costituiti dalla stessa linea cellulare non trattata.

3.6.4 Microscopia Elettronica A Scansione (SEM)

Successivamente abbiamo posto in coltura la linea cellulare delle HT29 su piastre da 24 wells con densità di 1×10^5 cells/well. La linea cellulare utilizzata è stata trattata con FW, ottenuta prima e dopo somministrazione di Goji.

Dopo 24h, le cellule sono state esposte a differenti concentrazioni (1% e 8%) di FW ed incubate per 24h, 48h e 72h. Come controllo negativo è stata utilizzata la stessa linea cellulare in presenza di solo terreno di coltura. L'esperimento è stato eseguito in triplicato.

Al termine dei tempi di incubazione si è proceduto alla rimozione del terreno e successivamente alla fissazione delle cellule su vetrino.

In breve: è stata eseguita una fissazione primaria in gluteraldeide 2% in tampone sodio cacodilato 0.1 M, pH 7.4, per 1 ora a 4° C, ed una post-fissazione in tetrossido di osmio all'1% nello stesso tampone usato come veicolo per il fissativo primario. Successivamente, i campioni sono stati sottoposti a disidratazione, eseguita prima in serie crescente di etanolo e completata con CO₂ col Critical Point Drying, eseguito con Emscope CPD 750.

I campioni sono stati resi conduttivi effettuando una metallizzazione con oro dello spessore di 100 Å (Sputter Coater, Polaron SC7640), osservati e fotografati per mezzo di un TESCAN VEGA LMU detector BSE (20 KeV).

3.7 RISULTATI

3.7.1 Saggi di vitalità in vitro:

- Estratto secco di bacche di Goji (capsule):

Il grafico (fig.13) rappresenta l'andamento relativo al trattamento della linea cellulare A375 a diverse concentrazioni di estratto secco di bacche di Goji in capsule a 24h, 48h e 72h.

I risultati non mostrano una rilevante differenza della vitalità cellulare alle concentrazioni più basse di estratto, mentre alle concentrazioni più alte si assiste ad un decremento della vitalità, in maniera tempo-dose dipendente.

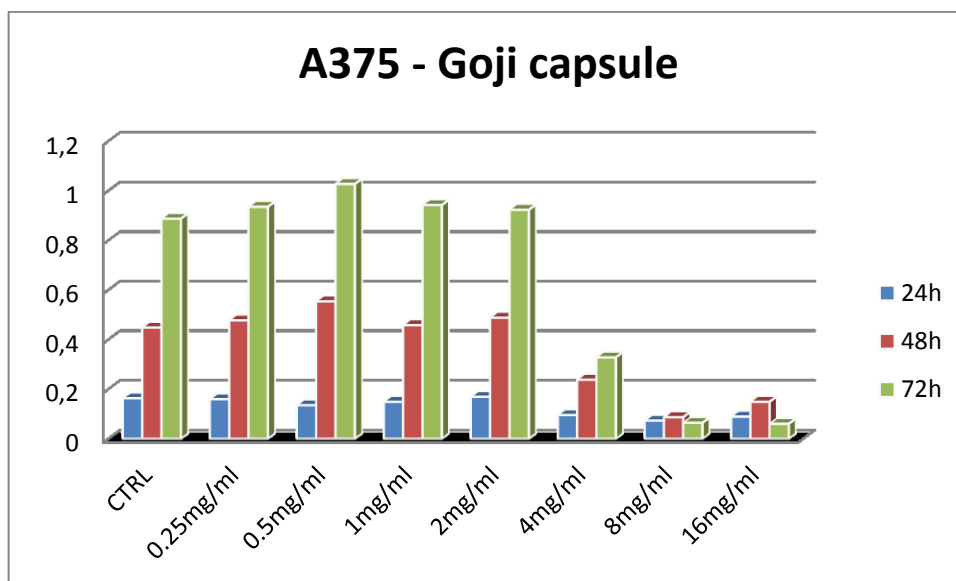


Figura 13 : trattamento linea cellulare A375 - Goji capsule

È possibile osservare lo stesso andamento anche nelle altre linee cellulari esaminate (Fig. 14)

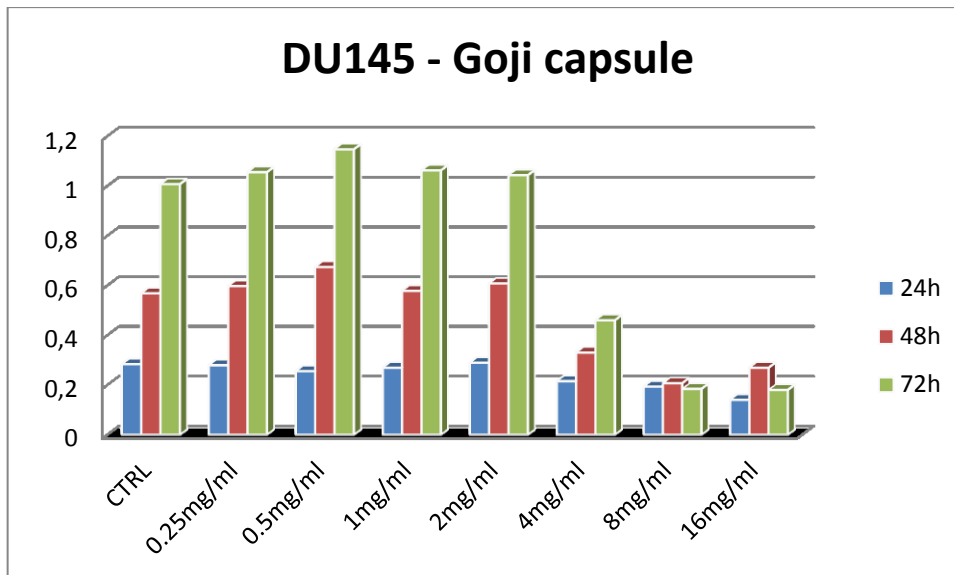


Figura 14 : trattamento linea cellulare DU145 - Goji capsule

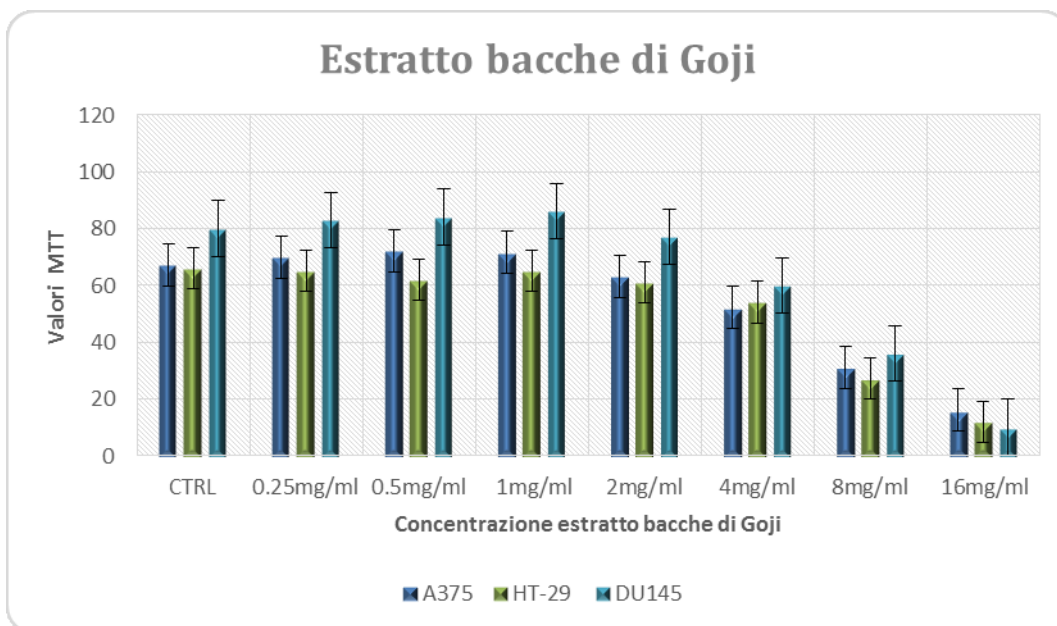


Figura 15: Trattamento di A375, HT-29, DU145 con estratto di bacche di Goji (capsule) a 48h

- Succo di bacche di Goji

I grafici (fig.16-17-18) rappresentano l'andamento relativo al trattamento delle linee cellulari A375 , DU145 ed HT29 a diverse concentrazioni di succo di bacche di Goji a 24h, 48h e 72h.

Si può osservare che il trattamento con succo di Goji influisce sulla vitalità cellulare solo alla concentrazione più alta (10%) sia nelle A375 che nelle DU145.

È più evidente una diminuzione della vitalità nelle A375 alle 48h rispetto alle DU145 dove questa si manifesta alle 72h. La maggiore resistenza delle DU145 all'effetto citotossico del trattamento potrebbe essere dovuta al tempo di duplicazione più lungo, caratteristica di questa linea cellulare.

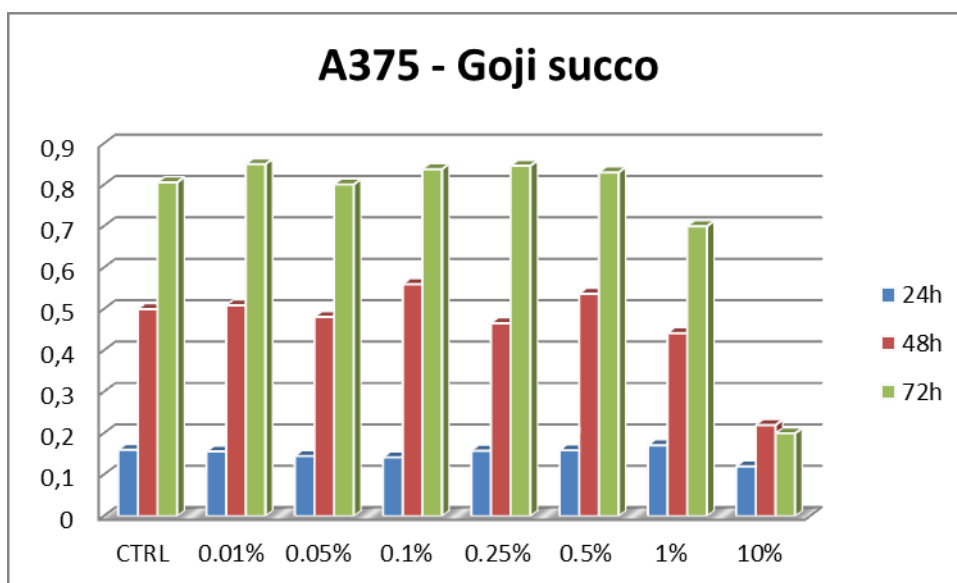


Figura 16 : trattamento linea cellulare A375 - Goji succo

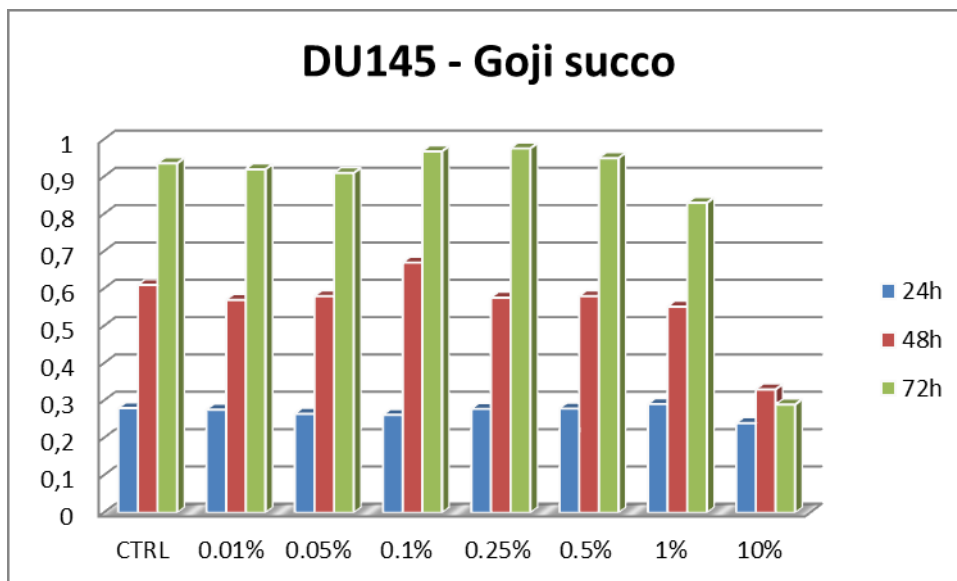


Figura 17: trattamento linea cellulare DU145 - Goji succo

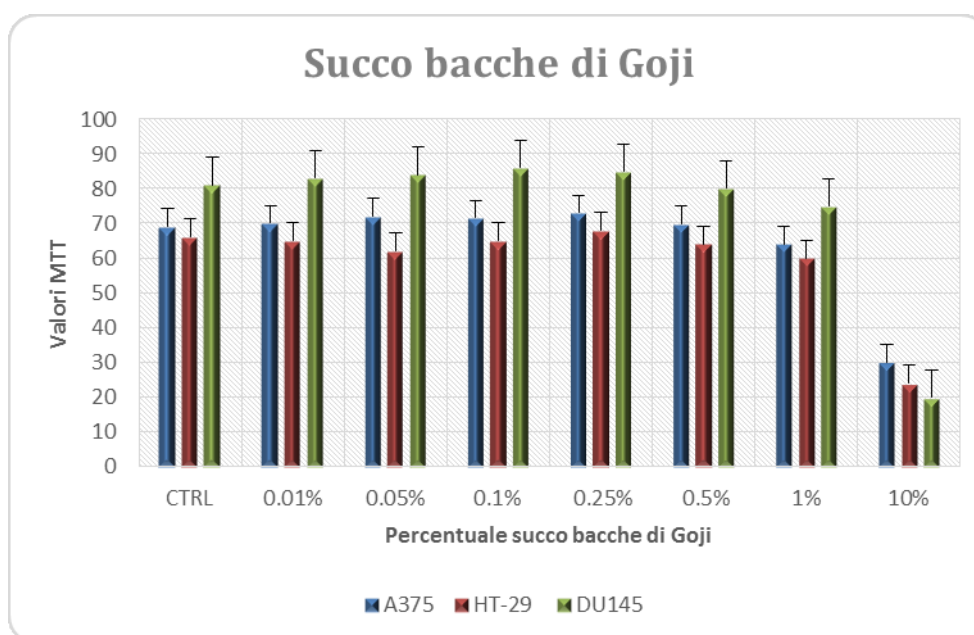


Figura 18 : Trattamento di A375, HT-29, DU145 con estratto di succo di Goji a 24h

3.7.2 Studio pilota

L'acqua fecale ottenuta dai campioni di feci dei partecipanti allo studio pilota, prima e dopo integrazione di bacche di Goji, è stata utilizzata per i saggi di vitalità nelle colture 2D.

3.7.3 MTT Assay su modello 2D

I dati riportati in figura 24 mostrano la vitalità cellulare testata tramite MTT assay. Nel trattamento con TNF- α si riscontra una minore vitalità che aumenta quando TNF- α è addizionato al succo di Goji, fino a mostrare il valore massimo in presenza del solo succo. Per quanto riguarda il trattamento con la FW, le Caco-2 trattate con Fw – post Goji mostrano una maggiore vitalità rispetto al trattamento con FW-pre Goji; tali valori risultano comunque maggiori di quelli ottenuti nel trattamento con il TNF- α .

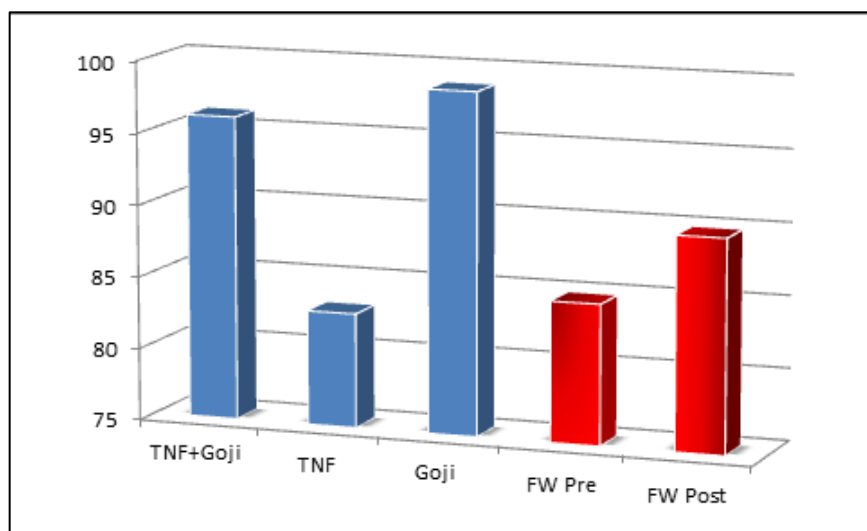


Figura 19 : Vitalità linea cellulare delle CaCo2 poste a trattamento con: soluzione di estratto di bacche di Goji all' 1%; TNF- α (25ng/ml); combinazione di estratto e TNF- α ; FW-pre e FW-post (8%) del campione C1

3.7.4 Espressione gene COX-2

Al fine di indagare i meccanismi coinvolti nella risposta al trattamento precedentemente descritto (TNF- α , Goji, TNF- α + Goji, FW-Pre, FW-Post) abbiamo effettuato un'indagine molecolare per comprendere l'espressione del gene COX-2, coinvolto nella risposta infiammatoria.

L'espressione di COX-2 è stata normalizzata utilizzando come gene housekeeping PGK1. (fig. 25)

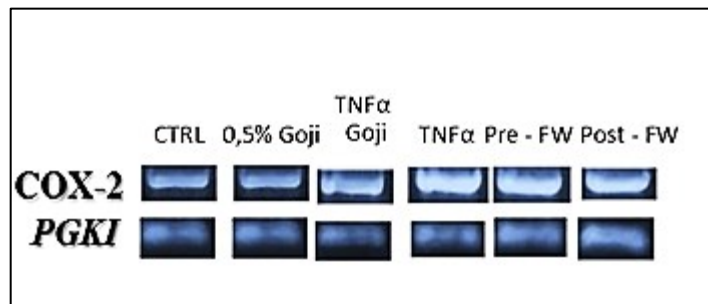


Figura 20: RT-PCR - espressione geni COX-2 e PGK1

In particolare è stata osservata una maggiore espressione di COX-2 nel trattamento con solo TNF- α rispetto a quello con TNF- α + Goji, mentre si riscontra un livello di espressione basale con solo il succo di Goji.

L'espressione di COX-2 è risultata essere maggiore anche nel trattamento con FW-pre Goji rispetto al trattamento con FW-post Goji.

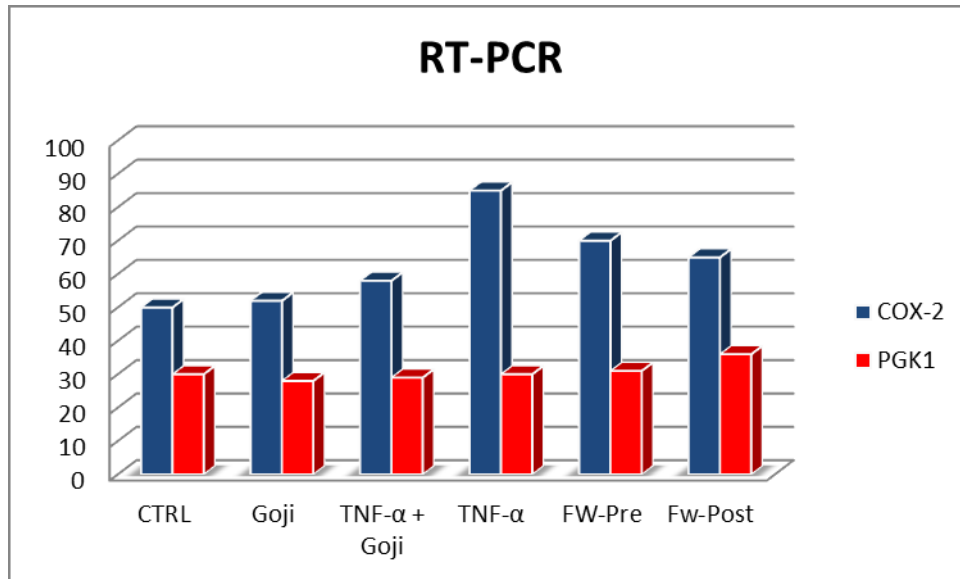


Figura 21 : Livelli di espressione dei geni COX-2 e PGK1 durante il trattamento

I risultati ottenuti mostrano una modulazione dell'espressione genica che ben si associa ai dati acquisiti con il precedente saggio di MTT.

3.7.5 Microscopia elettronica HT29

Le osservazioni morfologiche condotte su cellule di adenocarcinoma di colon incubate con FW pre e post-Goji, (1%, 8%) mostrano evidenti effetti citotossici dell'acqua fecale pre-Goji, alla maggiore concentrazione utilizzata. Il trattamento con FW-post Goji mostra, invece, una minore citotossicità, evidenziata da una morfologia cellulare più simile alle cellule non trattate (CTRL).

Il controllo presenta la classica crescita ad isolotti, con numerose cellule adese sulla superficie, e altre rotonde indice di attiva proliferazione (fig. 22-A).

Le cellule esposte al trattamento con FW pre-Goji (1%) non presentano alterazioni significative rispetto al controllo, anche se osserviamo una minore presenza di cellule in divisione e una maggiore dispersione di aggregati cellulari sulla superficie.

Tale condizione appare diversa nel trattamento con FW post-Goji (1%), dove si osserva una migliore attività proliferativa delle cellule e la citotossicità propria dell'acqua fecale sembra essere "tamponata" dalla presenza del Goji.

Nel trattamento con FW pre-Goji (8%) si osserva un'alterazione della morfologia cellulare e della membrana plasmatica. Infatti, la superficie cellulare mostra evidenti segni di sofferenza: microvilli allungati e vescicolazioni; numerosi detriti cellulari e cellule rotonde in degenerazione sparse sulla superficie.

La FW post-Goji(8%) sembra, invece, evidenziare un effetto positivo sulla tossicità dell'acqua fecale, dovuto all'integrazione delle bacche di Goji (Fig. 23,24).

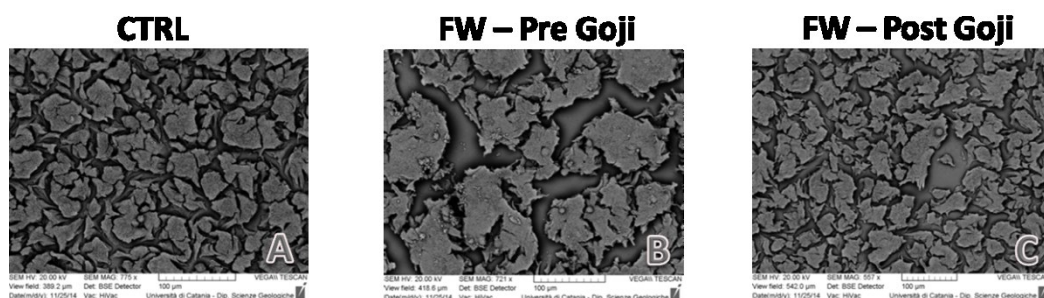


Figura 22 : HT29 SEM : A) CTRL ; B) FW -Pre Goji(8%) ; C) FW - Post Goji (8%)

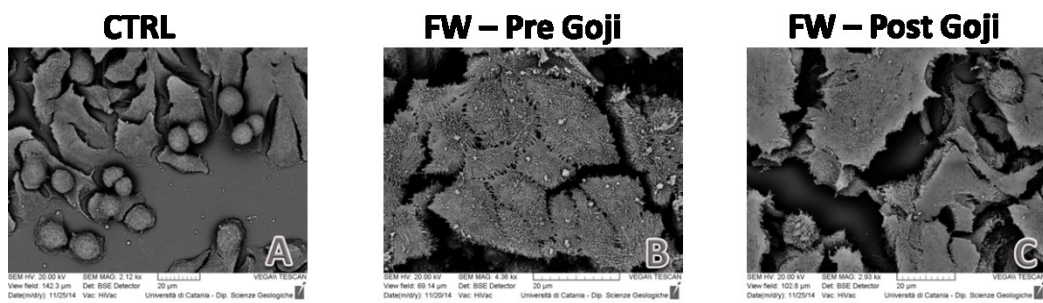


Figura 23 : HT29 SEM : A) CTRL ; B) FW –Pre Goji(8%) ; C) FW – Post Goji(8%)

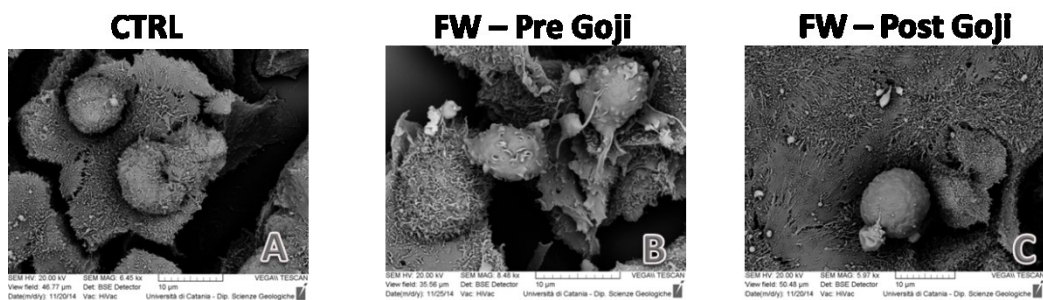


Figura 24 : HT29 SEM : A) CTRL ; B) FW –Pre Goji(8%) ; C) FW – Post Goji(8%)

3.7.6 *Esami ematologici*

La Fig.25 mostra i risultati presi in esame dei parametri chimico-clinici ed ematologici di uno dei 20 partecipanti per lo studio pilota, dove è evidente la diminuzione di solo due parametri, colesterolo e glicemia. Tale andamento lo si riscontra, similmente, in tutti i 20 soggetti reclutati per lo studio.

CAMPIONE 4	1°	2°	3°	4°	5°
COLESTEROLO	197 mg/dL	179 mg/dL	190 mg/dL	182 mg/dL	185mg/dL
TRIGLICERIDI	137 mg/dL	120,6mg/dL	236,3mg/dL	124,7mg/dL	103,6mg/dL
GOT	21 U/L	17 U/L	15 U/L	17 U/L	17 U/L
GPT	28 U/L	23 U/L	21 U/L	26 U/L	23 U/L
PCR	0,06 mg/dL	0,05mg/dL	0,05mg/dL	0,05mg/dL	0,06 mg/dL
RAT	20 U/mL	11,2 U/mL	10,2 U/mL	11,1 U/mL	9,3 U/mL
VES	7 mm/hr	4 mm/hr	4 mm/hr	9 mm/hr	8 mm/hr
GLICEMIA	1,29 mg/L	1,11 mg/L	1,37 mg/L	1,24 mg/L	1,27 mg/L

Figura 25 : Risultati analisi chimico-cliniche campione 4

I livelli ematici di glucosio e di colesterolo totale (Fig.26,27,28,29), indicano un decremento dopo integrazione con bacche di Goji rispetto ai periodi di wash-out, in cui invece tali valori risultano aumentati.

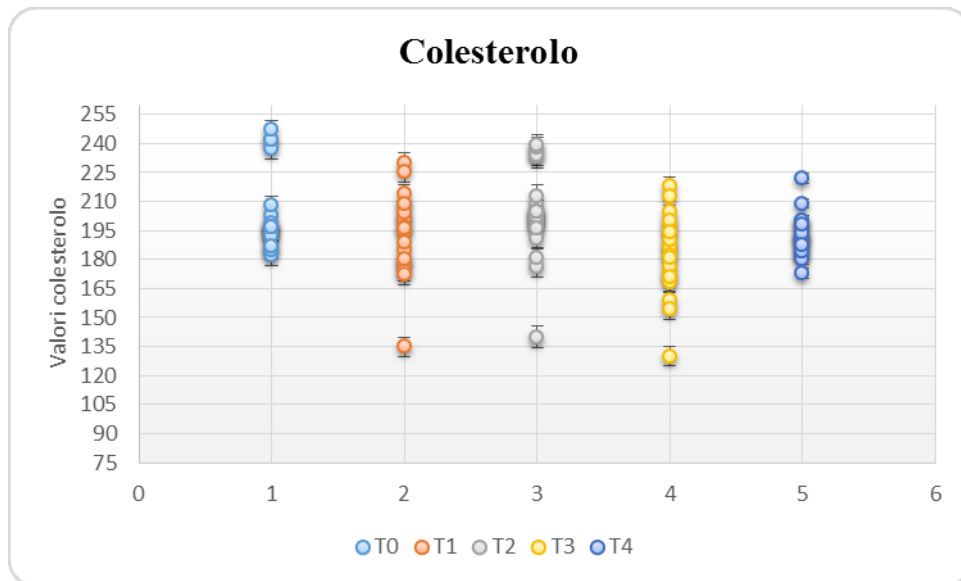


Figura 26 : Andamento valori colesterolo dei 20 soggetti - Studio pilota

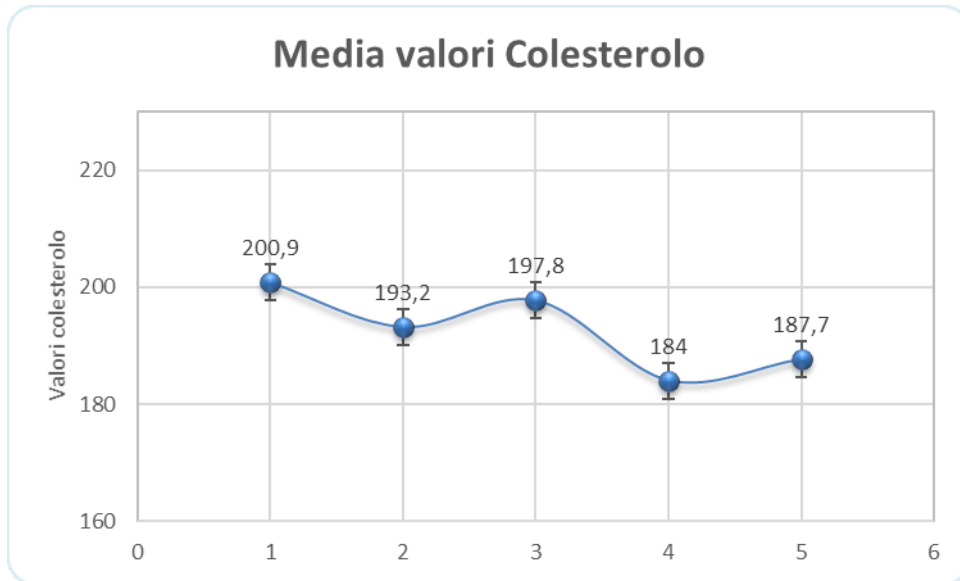


Figura 27 : Media valori colesterolo dei 20 soggetti - Studio pilota

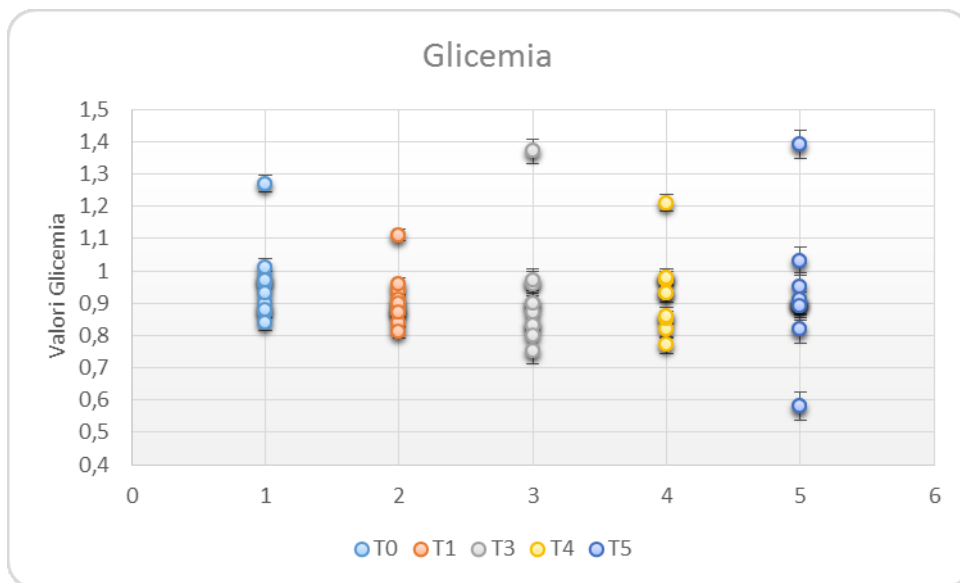


Figura 28 : Andamento valori glicemia dei 20 soggetti - Studio pilota

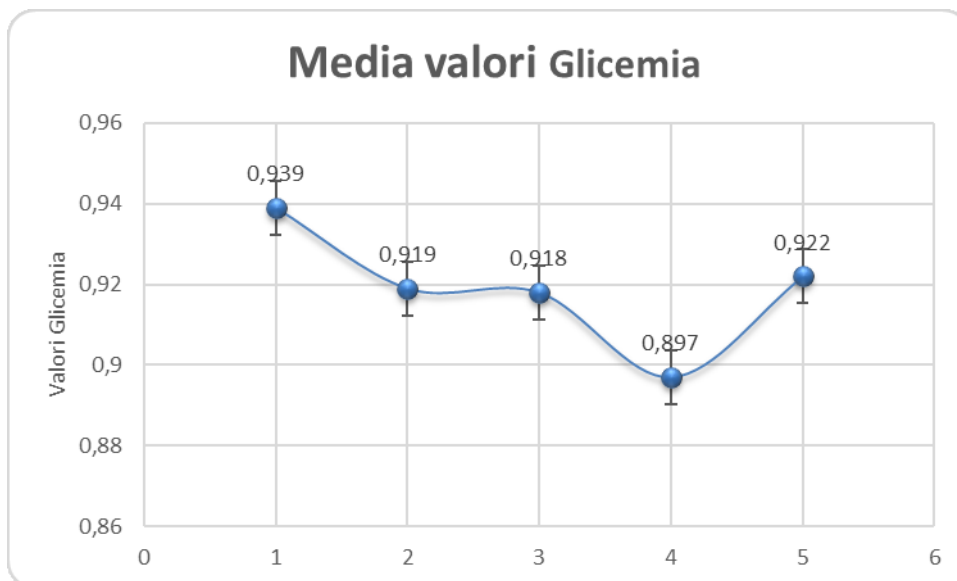


Figura 29: Media valori glicemia dei 20 soggetti - Studio pilota

Nello studio pilota, 13 dei 20 soggetti presi in esame, hanno mostrato una riduzione dei valori di glicemia; la diminuzione media totale è stata del 2.2%.

Per quanto riguarda i valori di colesterolo si è osservata una diminuzione media del 7%; in 17 soggetti il livello di colesterolo totale si è abbassato in maniera più evidente.

4. SPERIMENTAZIONE BRASSICA OLERACEA

4.1 BRASSICA

Le Brassicaceae sono una famiglia di piante erbacee che comprende circa 340 generi e 3700 specie [Pedras et al. 2010]³⁵.

Il nome è tratto dal celtico bresic (cavolo), ma sono note nella nomenclatura botanica anche come Cruciferae, nome derivante dall'aspetto dei fiori a quattro petali disposti a croce. Fra le più conosciute ritroviamo la Brassica oleracea, la più consumata in Europa e nel mondo. È una specie selvatica costituita a sua volta da numerose varietà, tra cui i comuni cavolfiori e broccoli (B. oleracea var. botrytis), i cavolini di Bruxelles (B. oleracea var. gommifera), le rape (B. oleracea var. gongylodes o B. caulirapa), la senape bianca (Sinapis alba), il ravanello (Raphanus sativus) e la rucola (Eruca sativa) (fig.30) [Cartea M.E. et al. 2011]³⁶.

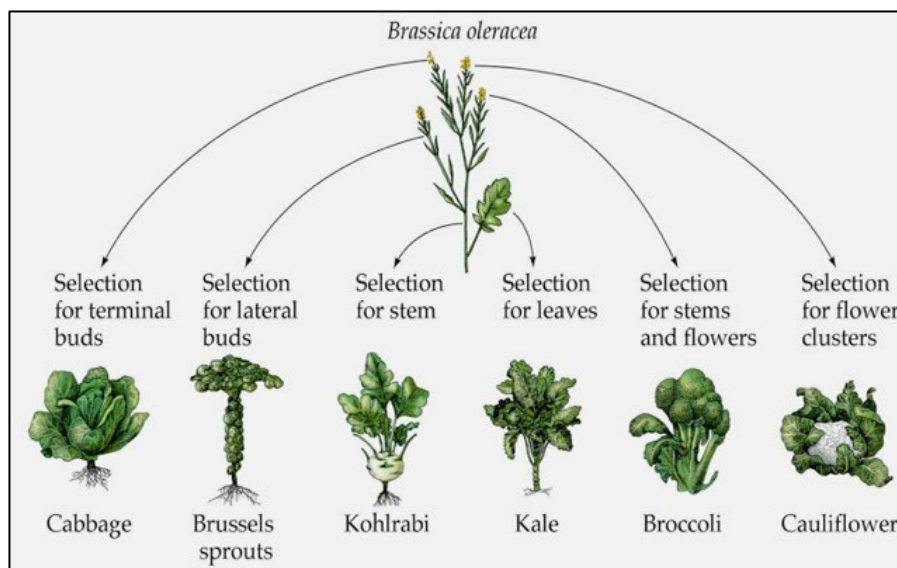


Figura 30 : Varietà di Brassica Oleracea

Le Brassicaceae sono caratterizzate da elevate proprietà antiossidanti, antiradicaliche e antitumorali. Tali proprietà sono conferite alle varie colture appartenenti a questa famiglia dalla presenza di composti bioattivi che svolgono una funzione protettiva e preventiva per alcune patologie.

Numerosi articoli, nell'ultima decade, hanno infatti dimostrato un ruolo protettivo di Brassica oleracea [Finley JW 2003³⁶, Zhang Y et al. 2007³⁷, Juge N et al. 2007³⁸, Dinkova-Kostova AT et al. 2008⁴, Lee JS et al. 2005⁴¹, Jeffery EH et al. 2008⁴², Myzak MC et al. 2006⁴³].

Questi vegetali sono particolarmente ricchi di glucosinolati (GLS); le sostanze biologicamente attive sono GLS alifatici e più precisamente glucorafanina e glucoiberina. I GLS sono convertiti in Isotiocianati (ITCs) bioattivi, sulforano e iberina c da un enzima, la mirosinasi, una glucosidasi presente sia nelle cellule vegetali sia nei batteri che compongono il microbiota dell'intestino umano.

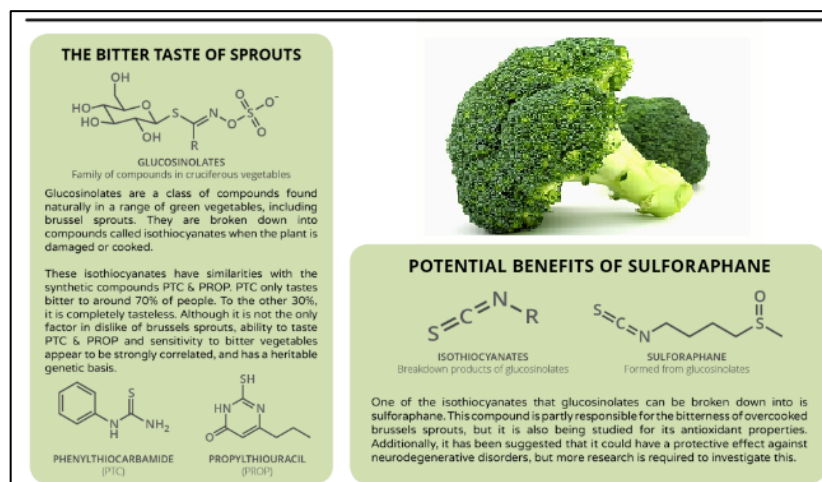


Figura 31 : Glucosinolati (GLS) - Sostanze biologicamente attive in *Brassica oleracea*

Gli isotiocianati vengono rilasciati a seguito di un danno degli ortaggi, ad esempio dopo cottura o in conseguenza della masticazione. L'isotiocianato più rappresentato nei broccoli è il sulforafane,

scoperto negli anni '90 e oggetto di numerosi studi finalizzati a comprenderne i ruoli fisiologici nell'organismo umano.

Dai numerosi studi presenti in letteratura, si evince che gli effetti salutistici delle Brassicaceae sono in qualche modo collegati a “*phytochemicals*” in esse contenuti, ovvero sostanze non-nutrienti della matrice vegetale dotati di numerose attività biologiche [Muller et al 2003]⁴⁴.

Proprio a questi composti è spesso attribuita la capacità di indurre il potenziale antiossidante e detossificante di cellule e tessuti. È però da sottolineare che in diverse varietà di brassica sono contenuti molti GLS con proprietà chimiche differenti e che, secondo la via di degradazione seguita, possono dare origine a prodotti strutturalmente e funzionalmente diversi. Sembra quindi riduttivo attribuire unicamente ad una singola classe di molecole, come gli ITCs, le proprietà di un vegetale che invece contiene una miriade di sostanze che possono interagire tra loro. Ecco perché gli studi scientifici hanno messo in evidenza che l'insieme dei *phytochemicals* presenti in un vegetale conferirebbe maggiore protezione rispetto a singole classi di molecole. Esempi emblematici sono rappresentati dal consumo selettivo di alcune varietà di Brassicaceae che hanno generato fenomeni di tossicità dovute all'induzione di specifiche isoforme di citocromo P450, di particolari vitamine (vitamina E) o provitamine (beta carotene), di stress ossidativo ed eventi genotossici [Sapone et al 2012]⁴⁵ [Fimognari et al 2012]⁴⁶⁻⁴⁷. È largamente riconosciuto che l'attività biologica di queste molecole naturali si esplica tramite molteplici meccanismi d'azione, tra cui la modulazione del metabolismo dei cancerogeni, la modulazione del ciclo cellulare, la

modulazione del sistema immunitario e ormonale, etc. [*Christen et al 2012*]⁴⁸, [*Holst et al 2004*]⁴⁹

Si è osservata la capacità di prevenire lo stress ossidativo, la capacità d'induzione degli enzimi di disintossicazione, di stimolare il sistema immunitario, di ridurre il rischio di tumori, d'inibire la trasformazione maligna e le mutazioni del DNA da cancerogeni, nonché di ridurre la proliferazione delle cellule tumorali. Le Brassicaceae sono fonte considerevole di antiossidanti ed esercitano anche un'azione antimutagena grazie alla presenza di polifenoli e composti solforati organici, al contenuto di glucosinolati, vitamine C ed E, carotenoidi ed enzimi antiossidanti, quali catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) e perossidasi. Tali composti sembrano anche avere effetti benefici contro patologie cardiovascolari, disordini neurologici, ed effetti anti-invecchiamento.

Nello studio di *Mukherjee S. et al.* [*Mukherjee S. et al ,2010*]⁵⁰ viene dimostrata l'azione cardioprotettiva per ischemia indotta in due gruppi di topi. Lo stesso studio lo si è trasferito nella sperimentazione umana, dimostrando una riduzione del rischio di cancro al polmone in soggetti di sesso maschile [*London et al. 2000*]⁵¹, [*Spitz MR et al. 2000*]⁵², [*Wang L et al. 2004*]⁵³ e di cancro al colon-retto.

Sfruttando le sue proprietà antiossidanti, anti-infiammatorie e antibatteriche, la Brassica oleracea è stata ampiamente utilizzata nella medicina tradizionale per la riduzione dei sintomi associati a disturbi gastrointestinali (gastrite, peptica e duodenali, ulcere, sindrome dell'intestino irritabile). La ricerca clinica ha mostrato effetti positivi del consumo di Brassica Oleracea nella dieta per la guarigione delle ulcere peptiche [*Cheney, 1949*]⁵⁴ favorendo anche la riduzione dei livelli di LDL nel siero [*Suido et al., 2002*]⁵⁵.

Gasper et al, [*Gasper et al*, 2005]⁵⁶ dimostra, sia in vivo che in vitro, l'attività antiossidante e anticancerogena degli isotiocianati, quali induttori di enzimi nel citocromo P450 nella fase I e induttore nella fase II di enzimi Redox (NAD⁺ - NADH - NADP⁺ - NADPH) nonché di coniugazione con composti tiolici (GSH) in un perfetto equilibrio protettivo per la cellula, sia nei processi flogistici che nei processi cancerogeni di cellule di mammifero.

In generale, gli effetti salutari delle Brassicaceae si esplicano principalmente tramite l'induzione degli enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II, l'inibizione degli enzimi bioattivanti di fase I, l'attività antiinfiammatoria, la capacità di regolare il ciclo cellulare e di indurre l'apoptosi in cellule tumorali.

4.2 GERMINELLI DI BRASSICA-OLERACEA

Recentemente, particolare attenzione è stata posta sui germinelli di Brassica oleracea, germogli a foglia, per la maggiore concentrazione di glucosinolati (GLS) presenti in essi rispetto al tradizionale prodotto fresco. I germinelli, infatti, contengono un quantitativo di GLS fino a 100 volte superiore a quello della pianta adulta e di vitamina C anche 200 volte superiore rispetto al seme. Il meccanismo d'azione che sostiene la funzione nutraceutica è determinato dall'idrolisi attivata dall'enzima mirosinasi che, idrolizzando i GLS, determina la formazione di diversi composti volatili, tra i quali gli isotiocianati. È stato dimostrato che piccole quantità di germogli di Cruciferae, dopo tre giorni di germinazione, hanno lo stesso potenziale di protezione contro i tumori di enormi quantitativi degli stessi ortaggi.

Sono numerosi i lavori scientifici e gli studi sul carcinoma della mammella e del colon in cui è stato riscontrato l'utilizzo di germogli di broccoli. [Fahey et al. 1997]⁵⁷.

Il Prof. *Akinori Yanaka*⁵⁸ ha presentato una ricerca nel 2005 (Frontiers in Cancer Prevention Research) nella quale si dimostravano le proprietà dei germogli di Cruciferae, nel caso particolare germogli di Brassica, nella riduzione dell'infezione sostenuta da *Helicobacter pylori* e quindi nella prevenzione dei tumori gastrici. La sperimentazione è stata effettuata su due gruppi di pazienti omogenei. Al primo gruppo, venivano integrati alla normale dieta 100 gr/die di germogli freschi di brassica; al secondo gruppo invece 100 gr/die di germogli freschi di Alfa Alfa, che si differenziano da quelli di Brassica per l'assenza di sulforafano. Come risultato dell'esperimento, nei pazienti del primo gruppo, rispetto a quelli appartenenti al secondo, è stata osservata una diminuzione del rischio di contrarre tumore gastrico.



Figura 32 : Germinelli di *Brassica oleracea*



Figura 33 : Germinelli di *Alfa Alfa*

4.3 COLTURE 3D

Lo studio delle patologie neoplastiche è stato condotto per anni su “classici” sistemi *in vitro* sviluppati su due dimensioni (2D), utilizzando colture di cellule adese a supporti di varia natura, al fine di mimare i ben più complessi sistemi tridimensionali di sviluppo tumorale che esistono *in vivo*.

Sebbene tutti i modelli disponibili abbiano contribuito da sempre in modo significativo, da qualche anno la ricerca sul cancro ha letteralmente raggiunto una nuova dimensione con l'avvento delle tecniche di coltura cellulare tridimensionale: i sistemi 3D.

Le colture cellulari bidimensionali rispecchiano solo parzialmente il modello delle cellule tumorali umane, sia dal punto di vista morfologico che da quello molecolare, non riuscendo a riprodurre il microambiente *in vivo*, soprattutto per quanto riguarda la cinetica di crescita, l'espressione genica ed il grado di differenziazione. Le colture cellulari tridimensionali mostrano caratteristiche molecolari peculiari che si discostano, anche notevolmente, dalle colture in monostrato, ma che si avvicinano maggiormente all'architettura strutturale del tumore *in vivo*.

In questo scenario, le colture cellulari tridimensionali (3D) costituiscono un approccio alternativo e/o parallelo al 2D, rappresentando un compromesso tra la coltura cellulare tradizionale e i più complessi modelli *in vivo*.

I modelli cellulari in 3D possono riprodurre in maniera accurata il microambiente tumorale e mimare i meccanismi regolatori che

intercorrono tra tumore e stroma. Al momento essi vengono utilizzati in diversi studi per individuare il ruolo delle molecole di adesione nell'invasività/formazione di metastasi e nell'angiogenesi, e per l'analisi del rimodellamento tissutale oltre che per lo studio di nuovi farmaci e agenti chemioterapici.

Le cellule tumorali all'interno di uno sferoide riproducono la stessa disposizione concentrica ed hanno un *pattern* di crescita simile ai tumori solidi nello stadio iniziale non vascolarizzato. Queste caratteristiche fanno degli sferoidi tumorali multicellulari un sistema più vicino alla struttura tumorale *in vivo* e li rendono un'ottima alternativa per lo studio dei diversi tumori.

Una tecnica per la produzione di sferoidi degli sferoidi è il metodo “*hanging drops*” (gocce pendenti). È un metodo semplice, che può essere utilizzato con diverse linee cellulari, comunemente utilizzato per indurre la formazione di corpi embrioidi da cellule staminali embrionali.

È possibile modificare la dimensione dello sferoide che si viene a formare semplicemente variando il numero di cellule nella sospensione cellulare. Prevede la deposizione di un piccolo volume di cellule (20-40µl) nel coperchio di una piastra petri oppure di una piastra a 96 pozzetti. Invertendo la piastra si forma una goccia “pendente” e le cellule, per gravità, si accumulano nel fondo della goccia, tendendo quindi ad aggregarsi in sferoidi. Per evitare l'evaporazione della goccia, il fondo della piastra viene riempito con PBS. Tale tecnica ha il vantaggio di poter formare singoli sferoidi di dimensioni uniformi e non richiede particolari attrezzature. Tuttavia non mancano gli svantaggi: comporta un minuzioso lavoro manuale per la raccolta dei singoli sferoidi; il volume della goccia sospesa deve

essere al di sotto dei 50 μ l, poiché con queste quantità la tensione superficiale è sufficiente alla ritenzione della goccia; il cambio del terreno di coltura è praticamente impossibile e, per questo motivo, è possibile solo per colture a breve termine. Non è quindi una tecnica finalizzata alla produzione su larga scala, tantomeno per uno studio a lungo termine.

4.4 Vescicole extracellulari ed ESOSOMI

La comunicazione cellulare rappresenta un processo cruciale negli organismi multicellulari e avviene tramite una serie complessa di segnali grazie ai quali le cellule sono in grado di coordinare le proprie attività a diversi livelli, fino a regolarne il fenotipo .

Classicamente in biologia cellulare, le cellule eucariotiche comunicano tra loro attraverso l'interazione diretta (segnalazione juxtacrina) e/o secernendo fattori solubili quali ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori, citochine e “vescicole extracellulari”. Questi fattori possono agire sulla cellula stessa (segnalazione autocrina) o avere un impatto sia su cellule vicine (segnalazione paracrina) che lontane (segnalazione endocrina). Con l'evoluzione si sono sviluppate fini strategie di comunicazione cellula-cellula. Mentre per gli ormoni e per i neurotrasmettitori le modalità di secrezione e i meccanismi d'azione sono generalmente ben noti , per le “vescicole extracellulari” sono ancora poco conosciuti.

Le cellule di organismi procarioti, eucarioti e piante secernono continuamente grandi quantità di microvescicole, complessi macromolecolari e piccole molecole nello spazio extracellulare.

Nell'uomo, queste vescicole membranose, rilasciate da una varietà di cellule, sono generalmente definite vescicole extracellulari (EV) e possono essere suddivise in tre classi principali: esosomi, microvescicole, corpi apoptotici.

I corpi apoptotici e le microvescicole sono derivate direttamente dalla membrana plasmatica e mostrano dimensioni e forma variabile (50-500 nm per i corpi apoptotici, 100-1000 nm per le microvescicole), mentre gli esosomi hanno caratteristiche chimiche e fisiche più omogenee.

In particolare, tra i diversi tipi di EV, gli esosomi sono piccole vescicole di membrana di origine endocitica (50-90 nm di diametro), hanno dimensioni nanometriche (30-100 nm) e vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare attraverso la fusione di corpi multivesicolari (MVB) con la membrana plasmatica. La struttura molecolare di queste vescicole può essere diversa e il loro carico molecolare dipende dal tipo di cellule d'origine e dal loro stato - ad esempio, trasformazione, differenziamento, stimolazione-, come ha sottolineato uno studio di *Johnstone et al.*⁵⁹⁻⁶⁰ che fu il primo ad isolare queste vescicole (Fig.34).

Si trovano in abbondanza nei fluidi corporei, tra cui sangue, saliva, urine e latte materno (in vivo). Contengono diversi costituenti molecolari della cellula che li produce, tra cui proteine, lipidi, mRNA e microRNA (miRNA).

La caratteristica che accomuna le diverse classi di EV è la loro capacità di trasferire proteine, lipidi e acidi nucleici, influenzando così diverse funzioni fisiologiche e patologiche sia delle cellule target che delle loro progenitrici. Per tale motivo, sono considerati oggi gli “attori” della comunicazione intracellulare.

Diversi tipi di cellule secernono esosomi contenenti specifici gruppi di proteine che differiscono da quelle contenute nelle vescicole di membrana rilasciate dalle cellule apoptotiche, suggerendo che gli esosomi sono attivamente secrete dalle cellule viventi. Il segnale per la secrezione non è ancora chiaro, anche se alcuni tipi di cellule sembrano rilasciare queste vescicole senza alcuna stimolazione apparente.

Altre cellule, tuttavia, come linfociti B e T, secernono esosomi solo quando vengono stimolati dal legame di un recettore sulla superficie cellulare.

Negli ultimi anni, lo sviluppo di tecniche per l'analisi delle proteine su larga scala ha permesso ai ricercatori di identificare in dettaglio il tipo di informazione trasportato dagli esosomi [*S. Mathivanan*]⁶¹.

Nel 2007, un gruppo guidato da Jan Lötvald in Svezia ha scoperto RNA messaggero e microRNA all'interno di esosomi [*H. Valadi et al., 2007*]⁶² e successivi esperimenti in vitro hanno provato che l'mRNA potrebbe essere tradotto in proteine nelle cellule bersaglio, fornendo la prima dimostrazione del trasferimento di informazioni genetiche tramite esosomi.

Questa notevole scoperta non solo conferma una nuova forma di comunicazione intercellulare, ma suggerisce che gli esosomi potrebbero probabilmente comportarsi in modo simile ai virus, nel senso che potrebbero trasportare nelle cellule bersaglio il materiale genetico che si traduce in proteine.

La scoperta e lo sviluppo concomitante della ricerca sui microRNA, ha scatenato il recente interesse per lo studio degli esosomi, con numerose evidenze in letteratura scientifica.

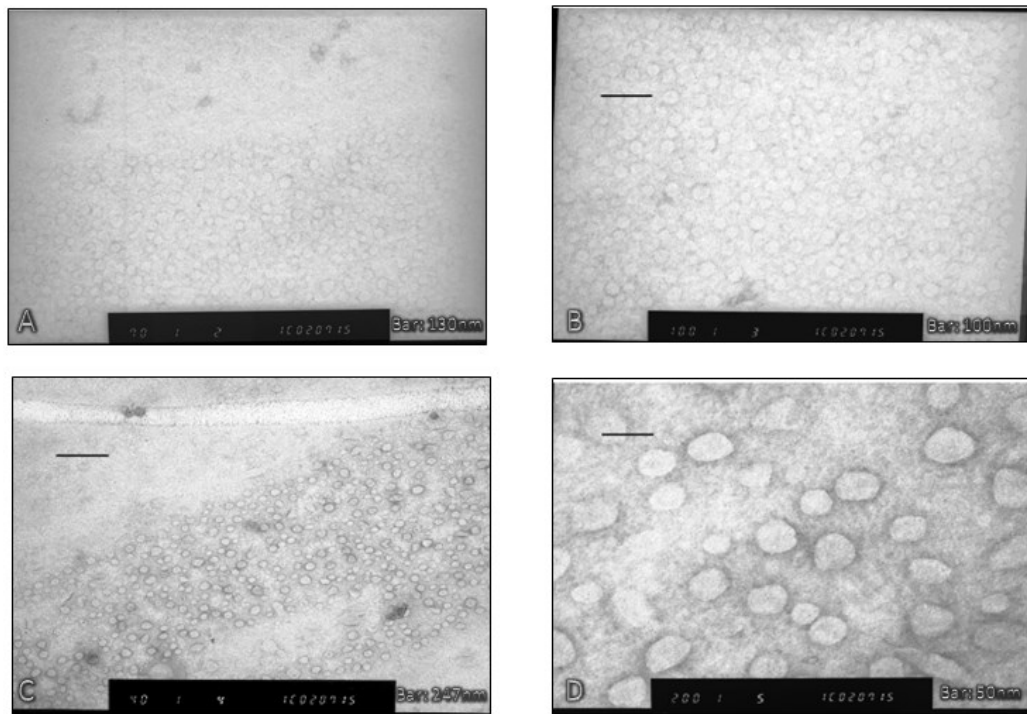


Figura 34 : Esosomi isolati dalla linea cellulare A2058

L'identificazione di mRNA negli esosomi e lo sviluppo di tecniche sempre più sofisticate per l'analisi degli acidi nucleici ha portato ad un recente aumento degli studi che riportano la presenza di sequenze di materiale genetico in questo tipo di EV. Si è visto che non tutti gli mRNA presenti in una cella finiscono negli esosomi, il che suggerisce che solo alcune sequenze specifiche di mRNA vengono confinate in queste vescicole e successivamente rilasciate.

Queste molecole di RNA incapsulate all'interno di vescicole sono protette dalla degradazione dell'RNasi, il che permette di essere recuperate negli esosomi da fluidi biologici. Molti lavori in corso si propongono di confrontare le sequenze di RNA e proteine isolate in vescicole da linee cellulari normali e tumorali con quelle isolate da esosomi dei fluidi biologici di pazienti con cancro e altre patologie.

Nonostante le incertezze circa la natura di mRNA e vescicole trasportanti miRNA, già alcune aziende biotecnologiche e farmaceutiche hanno iniziato a sviluppare progetti che mirano ad utilizzare il contenuto delle vescicole secrete come biomarcatori per varie malattie.

È ancora troppo presto per proporre il ricorso ad esosomi e al loro contenuto come nuovi biomarcatori (sia per la diagnosi, la prognosi, o previsione di risposte alle terapie), ma date le attuali evidenze scientifiche, i prossimi anni saranno sicuramente determinanti.

Non è da sottovalutare l'ipotesi che una migliore comprensione dei meccanismi di azione delle vescicole extracellulari può favorire lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nei confronti di diverse patologie come il cancro, le patologie autoimmuni e infiammatorie, il diabete, le malattie cardiovascolari e le malattie cronicodegenerative.

4.5 Isolamento di “ Esosomi ” Vegetali

*Zhang*⁶³ e colleghi hanno riferito che le particelle derivate da piante commestibili (uva, pompelmo, zenzero e carote) mostrano proprietà anti-infiammatorie nelle malattie gastrointestinali.

Studi in letteratura hanno suggerito che le vescicole extracellulari riscontrate nelle cellule vegetali possono essere considerate esosomi-simili (*Exosome-like*).

Inoltre potrebbero fungere da messaggeri extracellulari, mediando la comunicazione cellulare in modo simile agli esosomi secreti dalle cellule di mammifero. In particolare, tali nanoparticelle potrebbero funzionare in una comunicazione interspecie ed essere utilizzate nelle terapie naturali contro diverse patologie⁶⁴.

4.6 Materiali e metodi

4.6.1 *Linee cellulari*

Per gli esperimenti sono state utilizzate diverse linee cellulari acquistate dall'American Type Culture Collection (ATCC): **A-375** (ATCC® CRL-1619™) (cellule di melanoma maligno); **HT-29** (ATCC® HTB-38™) (cellule di adenocarcinoma colon-rettale); **fibroblasti umani** (ATCC PCS-201-212) , **A2058** (ATCC® CRL-11147™) (cellule di melanoma), **PBMC** (Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells)(ATCC® PCS-800-011™)(Normal Human) e **HL-60** (ATCC® CCL-240™) (Acute Promyelocytic Leukemia).

Il terreno di crescita specifico per le A375, le HT29, PBMC e HL60 è costituito da RPMI 1640 (Sigma Aldrich) arricchito con 10% di siero fetale (FBS) (Sigma Aldrich), 1% di L-glutammina (50U//ml) (Sigma Aldrich) e 1% di streptomicina/penicillina (50U//ml) (Sigma Aldrich).

Il terreno utilizzato per i fibroblasti è costituito da DMEM (Sigma Aldrich) arricchito con 10% di siero fetale (FBS) (Sigma Aldrich), 1% di L-glutammina (50U//ml) (Sigma Aldrich) e 1% di streptomicina/penicillina (50U//ml) (Sigma Aldrich).

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in coltura (Thermo Scientific, modello HERAcell150i) in condizioni di atmosfera standard ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO₂.

4.6.2 Estratto di succo di Germinelli

Il succo è stato ottenuto per spremitura dell' intero ortaggio mediante Slow Juicer (HURON) (Fig.35) ; il succo ottenuto è stato in un primo momento centrifugato a 3000rpm per 15 minuti, il surnatante recuperato è stato ulteriormente centrifugato a 10000 rpm per 10 minuti. Recuperata la fase liquida, è stata successivamente filtrata con filtri 0.45 μm e 0.22 μm e stoccata in eppendorf da 1.5ml e conservate a -80°C fino al suo utilizzo.



Figura 35 : Slow Juicer (HURON)

4.6.3 CITOTOSSICITÀ ESTRATTO

Le linee cellulari sono state piastrate alla densità di 3000 cell/well in piastre da 96 wells in un volume finale di 200 μl . Dopo 24h, ciascuna linea cellulare è stata trattata a differenti

concentrazioni di succo (0.01%, 0.05%, 0.1%, 1%,5%, 10%), per la valutazione della vitalità cellulare mediante MTT assay a 24h, 48h e 72h di incubazione . Come controllo negativo sono state utilizzate le stesse linee cellulari in presenza di solo terreno di coltura. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

4.6.4 MTT ASSAY

Secondo il protocollo già descritto in “Materiali e Metodi” paragrafo 3.5.5 pag. 29.

4.6.5 TRATTAMENTO DI PBMC E HL60

Inoltre sono stati valutati gli effetti citologici del succo di Brassica su modelli di cellule normali e di cellule differenziate. I modelli cellulari utilizzati sono stati i linfo-monociti isolati dal sangue periferico umano (PBMC) e le cellule tumorale HL60, linea cellulare derivata da una leucemia promielocitica acuta umana, indotte a differenziarsi in monociti-macrofagi. Le HL60, infatti, si differenziano verso la linea mieloide in risposta al trattamento con Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA);quest’ultimo modello sperimentale di differenziazione cellulare è ampiamente descritto e utilizzato in letteratura.

- Separazione delle cellule mononucleate (PBMC) da sangue periferico e trattamento con brassica

Le cellule mononucleate sono state isolate da campioni di sangue periferico mediante centrifugazione su gradiente di densità di Ficoll. Con tale metodica è possibile separare tre fasi di differente densità: la fase rossa sul fondo della provetta, contenente eritrociti e polimorfonucleati, un anello bianco-opaco centrale in cui si trovano le cellule mononucleate (linfociti e monociti) e la fase sovrastante che contiene piastrine e plasma.

L'anello linfo-monocitario è stato recuperato, lavato 2 volte in PBS 1X e le cellule risospese in RPMI sono state contate e diluite alla concentrazione di 10^6 /ml.

Le cellule sono state piastrate alla concentrazione di 15×10^4 cells/well e trattate con succo di germinelli di Brassica a diverse concentrazioni (0.01%; 0.5%; 2.5%).

Per verificare e confermare l'avvenuta differenziazione in monociti-macrofagi si è proceduto all'analisi citofluorimetrica valutando la presenza degli antigeni di superficie CD14 e CD11b, marcatori della linea mieloide.

L'espressione dei marcatori di superficie per i monociti è stata analizzata con immunofluorescenza diretta e citometria a flusso, usando il citofluorimetro FACSCanto2 (BD), presso il reparto trasfusionale di Ragusa, secondo il seguente protocollo.

Le cellule sono state staccate e 100 μ l di sospensione cellulare sono stati incubati con gli anticorpi marcati anti-CD14 (coniugato PE) e anti-CD11b (coniugato FITC) al buio per 20' a RT. In seguito le cellule sono state centrifugate per 5' a 1200 rpm e i pellet, risospesi in

0,5 ml di PBS, sono stati letti al citofluorimetro.

- Cellule tumorali HL60 indotte a differenziazione mediante trattamento con PMA

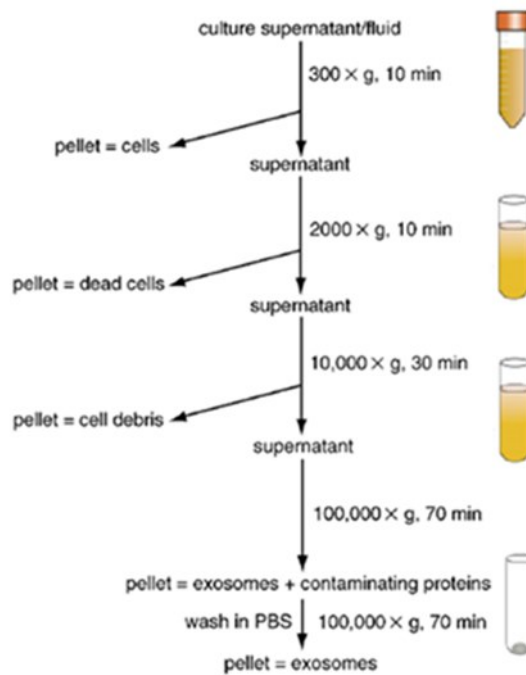
Le cellule tumorali HL60 sono state risospese ad una concentrazione finale di 1×10^6 cellule/ml in terreno di coltura RPMI 1640 arricchito con il 10% di FBS, L-glutammina (2 mM) e penicillina/streptomicina (10 U/ml). Le cellule HL60 sono state poste in coltura in multiwell da 96 pozzetti, alla concentrazione di $2,5 \times 10^4$ cells/well e incubate per 72 ore a 37°C in atmosfera umida al 5% di CO₂, in presenza o in assenza di 20 ng/mL di PMA e di estratto di Brassica in percentuali crescenti (0.01%; 0.5%; 2.5%).

4.6.6 SEPARAZIONE DI "ESOSOMI" VEGETALI

50ml di succo di germinelli di Brassica sono stati centrifugati secondo la procedura di Thèry et al. [Thèry et al., 2002]⁶⁵.

Il seguente diagramma di flusso raffigura la procedura di purificazione degli esosomi sulla base di differenti ultracentrifugazioni. La velocità ed i tempi di ogni centrifugazione sono indicate alla destra delle frecce (Fig.36).

Dopo ciascuno delle prime tre centrifugazioni, il pellet (contenente cellule, cellule morte, detriti cellulari) vengono scartati ed il surnatante viene recuperato per il passaggio successivo. Al contrario, dopo le due centrifugazioni a $100,000 \times g$, il pellet (contenente esosomes) viene raccolto ed il surnatante viene scartato.



Ultracentrifuge and Rotor Information for Exosome Purification							
Rotor (Beckman)	Tubes (Beckman)	Max vol/tube (ml)	Max vol/rotor (ml)	rpm for 10,000 × g	rpm for 12,000 × g	rpm for 100,000 × g	rpm for 110,000 × g
SW 41 or 40 (swinging bucket)	Polyallomer	12	72	7,500	8,200	24,000	25,000
SW 28 or 32 (swinging bucket)	Polyallomer	30	180	7,500	8,200	24,000	25,000
70 Ti	Polycarbonate bottle	22	180	10,000	11,000	31,000	32,000
45 Ti	Polycarbonate bottle	68	400	9,000	10,000	30,000	31,000
TLA-100.3	Thick-walled	3	18	13,000	15,000	43,000	45,000
TLA-110	polycarbonate	5	40				

Figura 36 : Protocollo separazione di Esosomi secondo la procedura di Thèry et al.

Il pellet di esosomi è stato risospeso in 10ml di PBS , filtrato con filtri da 0.45um e 0.2 um e concentrato tramite amicon 3000k fino ad ottenere 1ml di concentrato.

4.6.7 ATTIVITA' ANTIPROLIFERATIVA

4.6.7.1 Generazione di sferoidi con il metodo "hanging drops"

Le cellule sono state contate e 2500 cellule in un volume di 40 μ l sono state piastrate sul coperchio di piastre di Petri (100mm di diametro)

In tal modo si forma una "goccia pendente" e le cellule sono indotte ad aggregarsi sul fondo della goccia per effetto della forza di gravità. Per ridurre il fenomeno dell'evaporazione, le piastre sono state riempite con PBS sterile (Fig. 37).

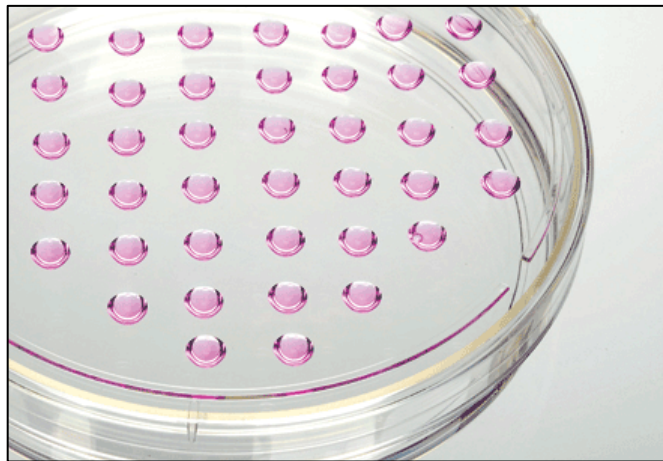


Figura 37 : Generazione di sferoidi utilizzando il metodo "hanging drops"

4.6.7.2 Trattamento degli sferoidi

Gli sferoidi sono stati coltivati in incubatore a 37°C al 5% di CO₂. La progressiva formazione dello sferoide è stata valutata dopo 3-4 giorni di coltura e fino a 14 giorni, utilizzando un microscopio invertito a contrasto di fase (Nikon Eclipse TS100, Nikon Co.)(Fig.38).

Gli sferoidi ottenuti sono stati trattati con diverse concentrazioni di estratto (0,1%; 0,5%; 2,5%; 12,5%) ed “esosomi” di brassica (5% e 10%).

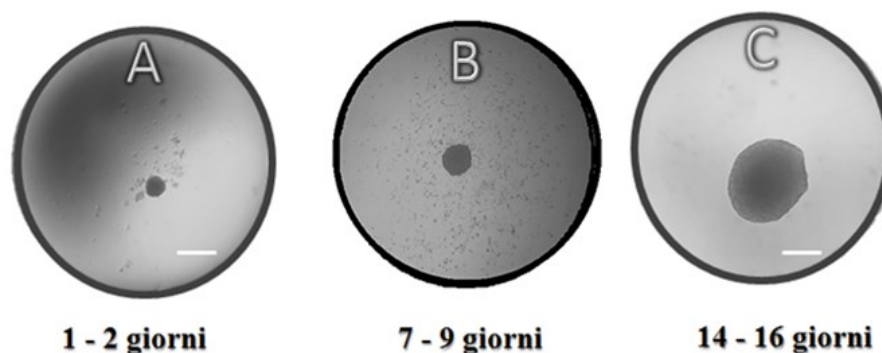


Figura 38 : Progressiva formazione dello sferoide

4.6.7.3 Saggio di migrazione cellulare – SCRATCH TEST

Lo scratch test è un test sviluppato per la valutazione in vitro della capacità di migrazione e proliferazione cellulare. Le cellule A2058 (ATCC® CRL-11147™) sono state piastrate (2×10^5 cells/well) in piastre a 6 pozzetti. Raggiunto il 70/80% di confluenza, è stato creato uno scratch o solco sul monostrato cellulare raschiandolo con un puntale sterile.

Il monostrato cellulare è stato dunque lavato con PBS per rimuovere le cellule galleggianti ed è stato aggiunto terreno RPMI . Nelle prove controllo le cellule sono state incubate in presenza del solo terreno di coltura. Subito dopo aver effettuato lo scratch e dopo 24 e 48 h di incubazione sono state acquisite le immagini usando un microscopio Leica DMR dotato di fotocamera digitale (ingrandimento 8x). Le

immagini del monostrato/trattato sono state confrontate con quelle del monostrato/controllo, per valutare la capacità delle cellule di richiudere la “ferita” provocata dallo scratch .

4.7 RISULTATI

4.7.1 *Citotossicità - MTT ASSAY*

Per valutare gli effetti dell'estratto di Brassica, in un primo momento è stato eseguito un saggio di vitalità sulle seguenti linee cellulari A375, HT29 e Fibroblasti trattate con concentrazioni crescenti di succo.

Nelle figure seguenti (Fig. 39,40,41) vengono riportati i dati del saggio MTT ottenuti a concentrazioni e a tempi diversi.

Come si può apprezzare l'estratto di Brassica oleracea, inibisce la proliferazione cellulare in maniera dose-tempo dipendente nelle due linee cellulari tumorali, mentre evidenzia una bassa attività citotossica sui Fibroblasti.

Nelle A375 e HT29 l'azione citotossica è più evidente all'aumentare della concentrazione, infatti, già a partire dallo 1% si comincia ad osservare un certo effetto inibitorio sulla crescita; effetto che diventa palesemente evidente alla concentrazione 5% .

Tale azione è ancora più evidente con l'aumentare dei tempi di esposizione al trattamento.

Nei fibroblasti, l'azione citotossica inizia ad assumere valori apprezzabili solo alla concentrazione del 5%, risultando poi chiaramente tossica alla concentrazione più elevata, 10%.

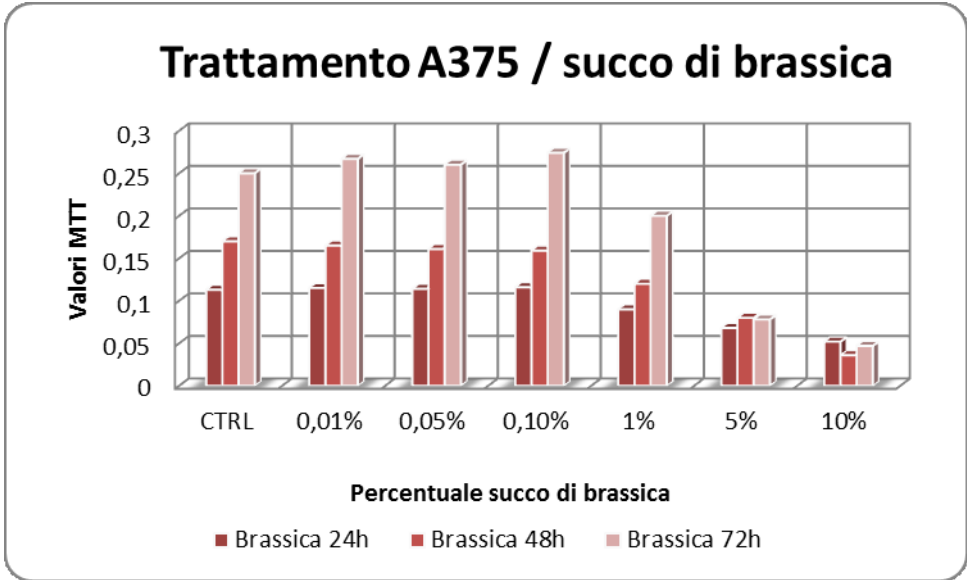


Figura 39 : Vitalità delle linee cellulari A375 trattate con soluzione di succo di Brassica alle diverse concentrazioni (0.01%, 0.05%, 0.1%, 1%,5%, 10%) 24h - 48h - 72 h.

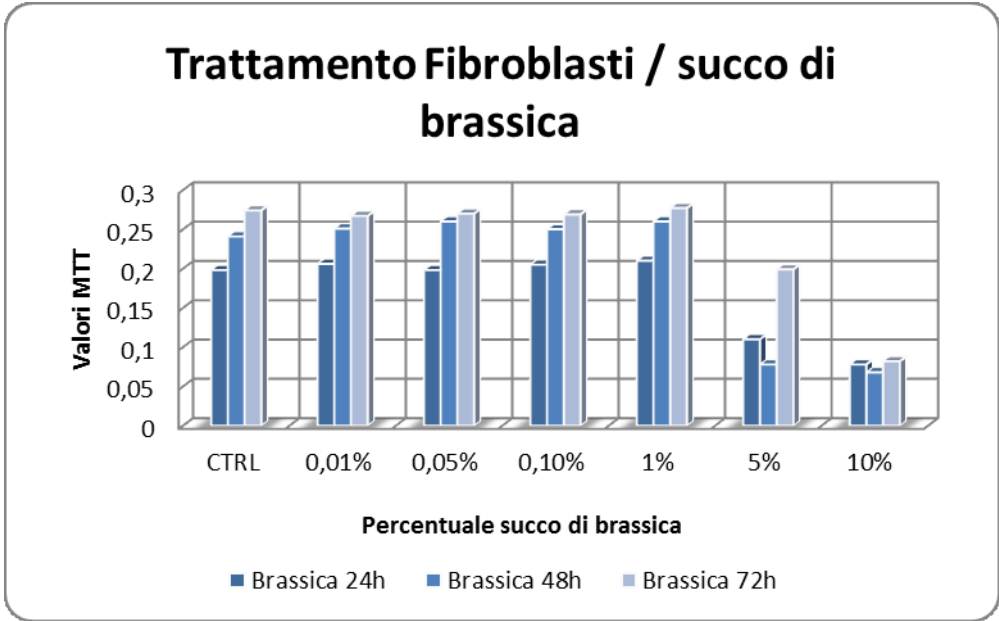


Figura 40 : Vitalità delle linee cellulari Fibroblasti trattate con soluzione di succo di Brassica alle diverse concentrazioni (0.01%, 0.05%, 0.1%, 1%,5%, 10%) 24h - 48h - 72 h.

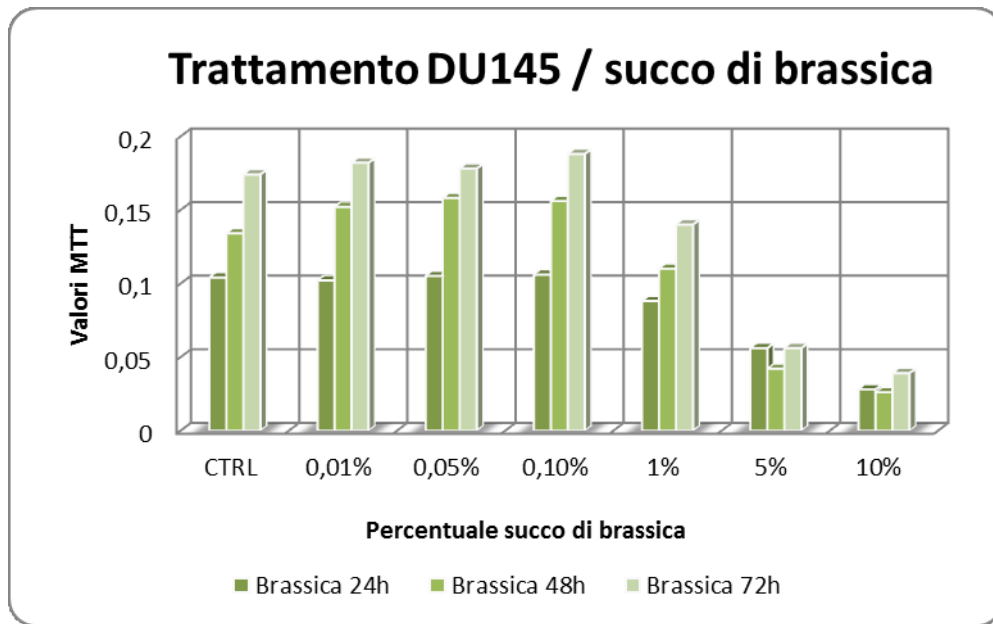


Figura 41 : Vitalità delle linee cellulari DU145 trattate con soluzione di succo di Brassica alle diverse concentrazioni (0.01%, 0.05%, 0.1%, 1%,5%, 10%) 24h - 48h - 72 h.

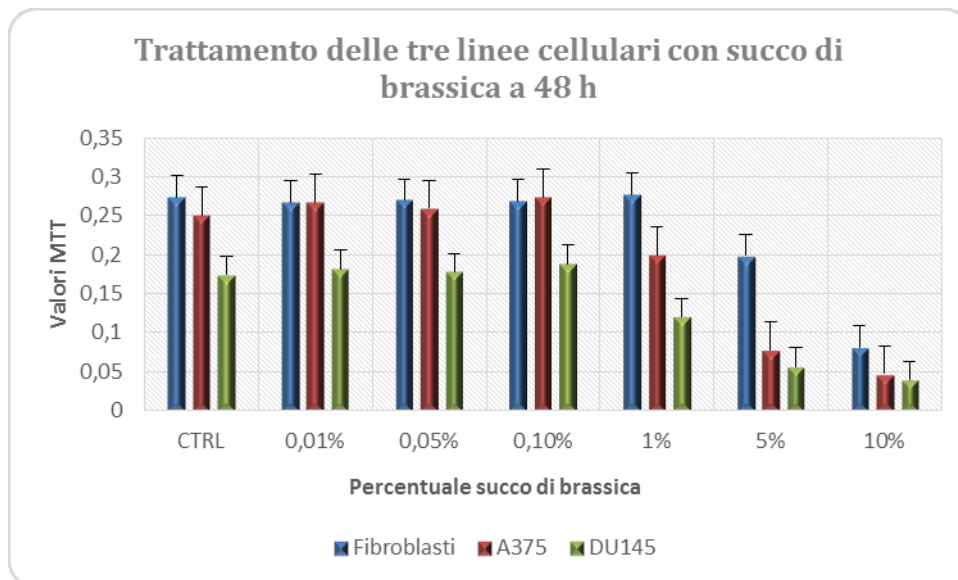
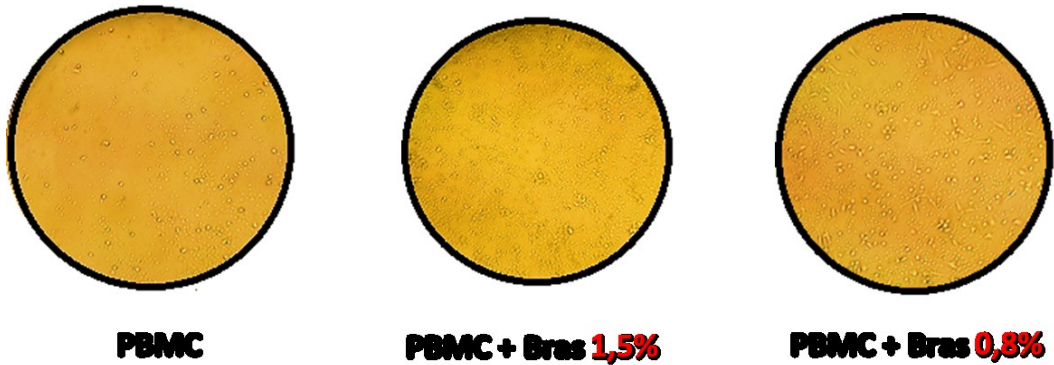


Figura 42 : Vitalità delle linee cellulari A375, PC3, Fibroblasti trattate con soluzione di succo di Brassica alle diverse concentrazioni (0.01%, 0.05%, 0.1%, 1%,5%, 10%) - 48h.

4.7.2 TRATTAMENTO DI PBMC

- OSSERVAZIONE AL MICROSCOPIO

Dall'osservazione al microscopio si nota un aumento del numero di cellule in adesione monocito-macrofago simili.



- CITOFUORIMETRIA (CD14)

Dalle analisi dei profili citofluorimetrici (Fig. 43) si nota un aumento di elementi positivi per il marcatore di superficie CD14.

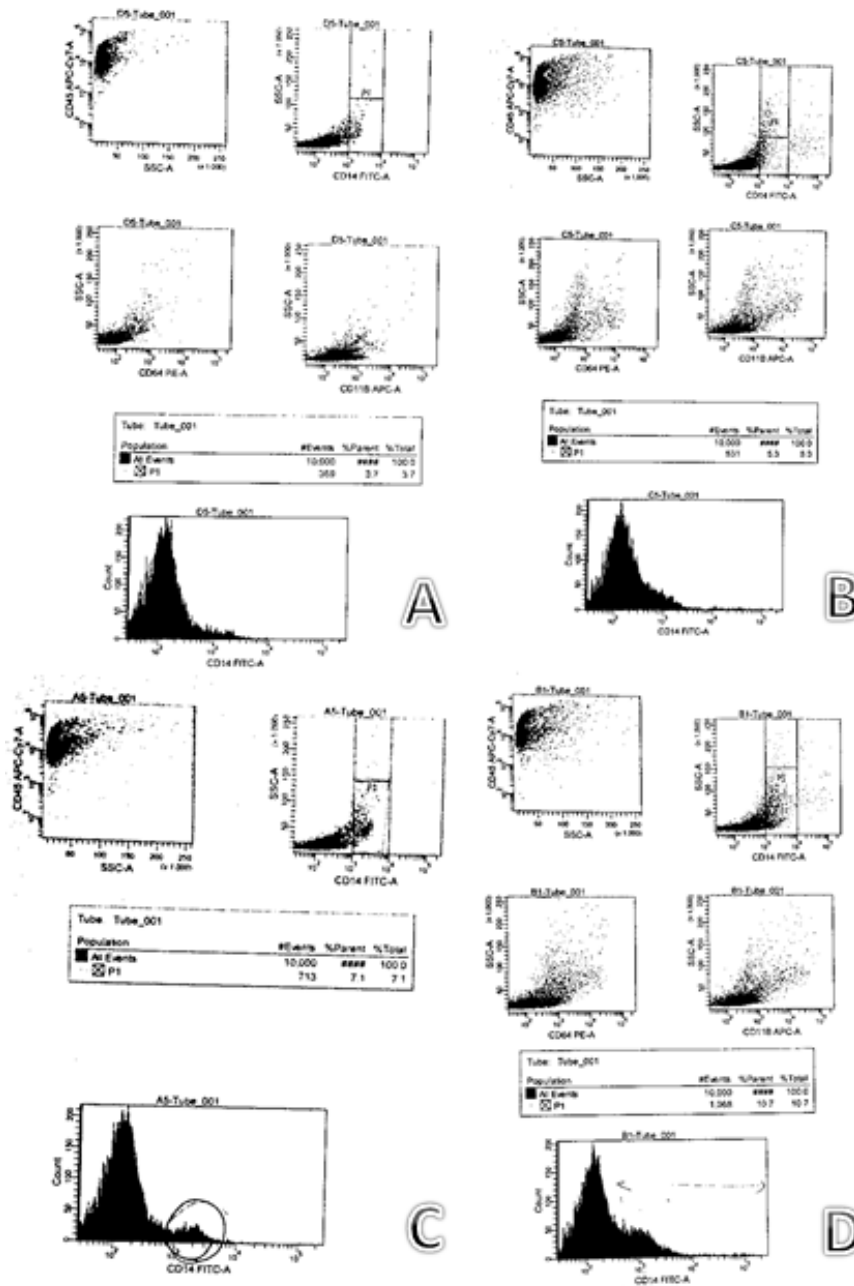


Figura 43 : Citofluorimetria PBMC A) PBMC, B) PBMC + 0.1% Brassica, C) PBMC + 0.5% Brassica, D) PBMC + 2.5% Brassica

4.7.3 TRATTAMENTO DI HL60

- CITOFUORIMETRIA (CD14)

Per approfondire quest'aspetto si è utilizzato una linea cellulare, HL60, indotta a differenziazione in monocito- macrofagi tramite phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

I dati di citofluorimetria confermano l'azione differenziante dell'estratto di brassica (Fig.44).

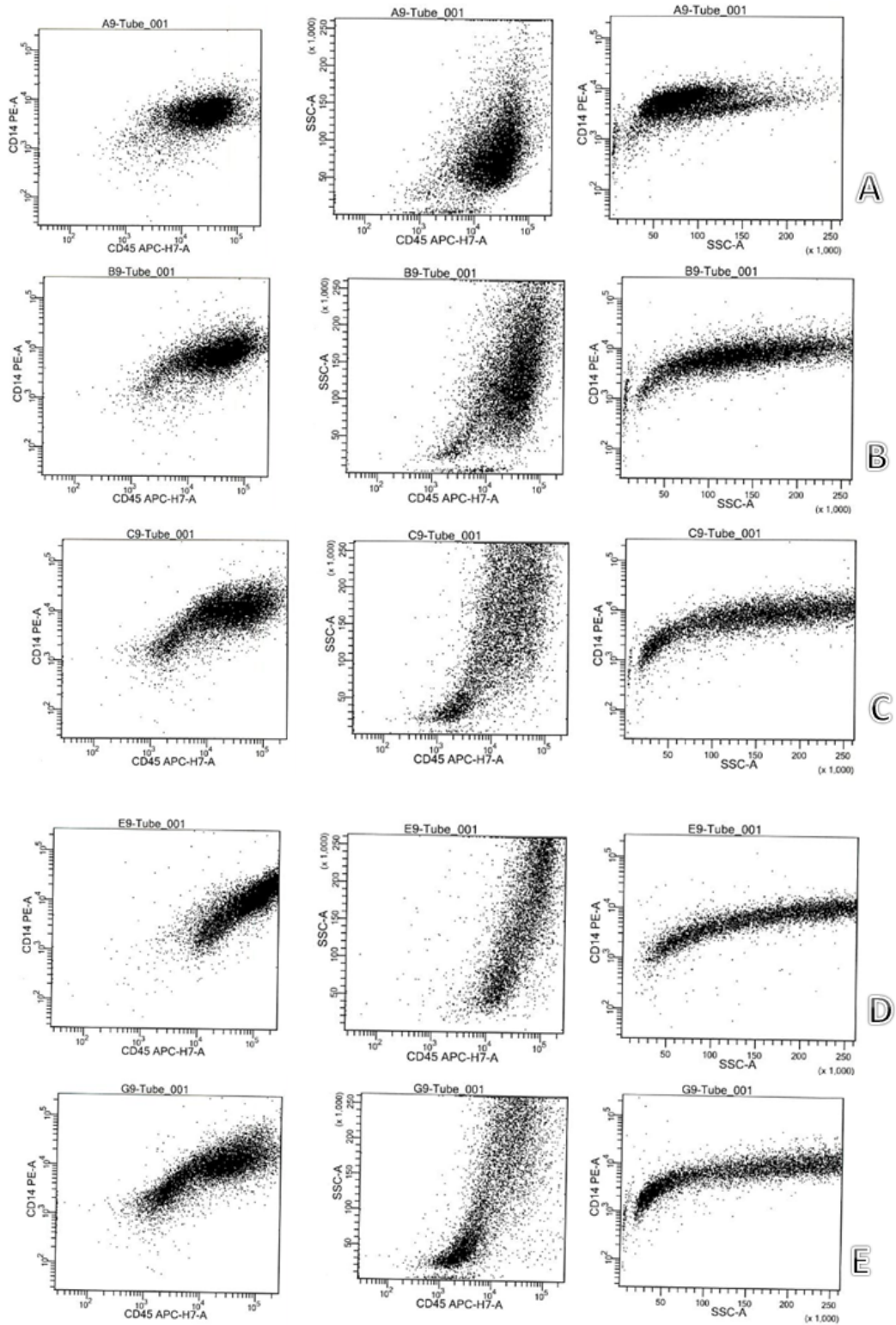


Figura 44 : Citofluorimetria HL60 A) HL60 , B) HL60 + PMA [20 ng/ml] C) HL60 + Brassica 0.01%, D) HL60 + Brassica 0.5%, E) HL60 + Brassica 2.5%..

4.7.4 *Trattamento con “Esosomi” vegetali*

Dall'osservazione degli sferoidi trattati con “esosomi” di germinelli di Brassica a diverse concentrazioni si può notare nel controllo l'adesione ed una rapida espansione delle cellule a coprire la superficie della piastra. Questo comportamento non è riscontrabile negli sferoidi trattati con “esosomi” in cui si osserva un nucleo denso, la perdita della proliferazione nella regione intermedia, oltre che un calo evidente della regione periferica dove la crescita delle cellule sembrerebbe inibita.

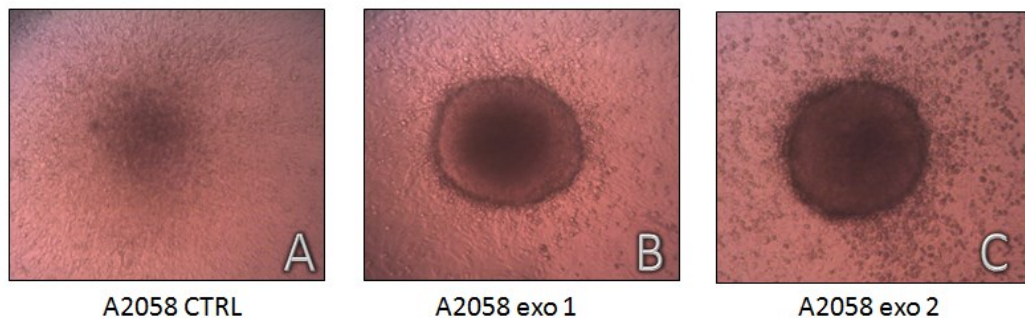


Figura 45 : Sferoidi di A2058 A) CTRL ; B) esosomi al 10% ; C) esosomi al 20% - osservati a 48h

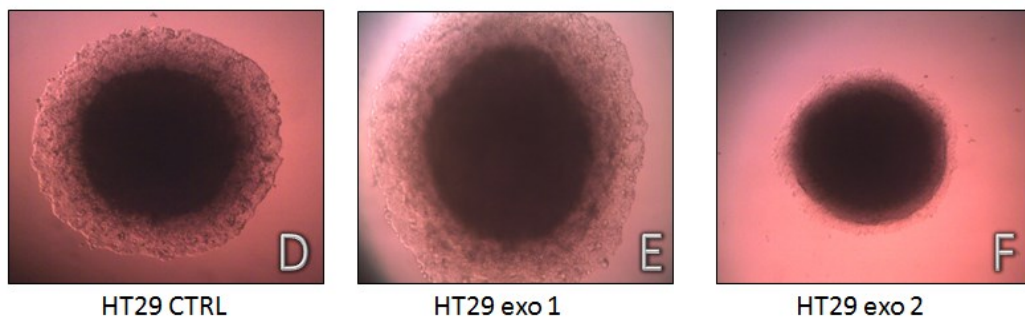


Figura 46 : Sferoidi di HT29 A) CTRL ; B) esosomi al 10% ; C) esosomi al 20% - osservati a 48h

4.7.5 Saggio di migrazione cellulare – SCRATCH TEST

Ulteriore conferma degli effetti degli “esosomi” sulla capacità proliferativa delle cellule da noi prese in esame ci è stata fornita dai risultati dello Scratch test, con cui ci è stato possibile valutare qualitativamente le capacità migratorie delle cellule. Questo saggio, convenzionalmente utilizzato per valutare la migrazione cellulare simulando il meccanismo di riparazione delle ferite, è stato eseguito trattando le A2058 con “esosomi”. La migrazione cellulare è stata monitorata a 24 e 48 ore.

In Fig. 47 è riportata l’immagine relativa al saggio subito dopo aver effettuato l’incisione, che appare di conseguenza con margini ben definiti. Alle 24 ore si nota nelle A2058 controllo che le cellule tendono a migrare verso il centro dell’incisione come a cercare di ricostituire un monostrato confluyente; tale aspetto non è apprezzabile nelle A2058 trattate con “esosomi” (Fig.48).

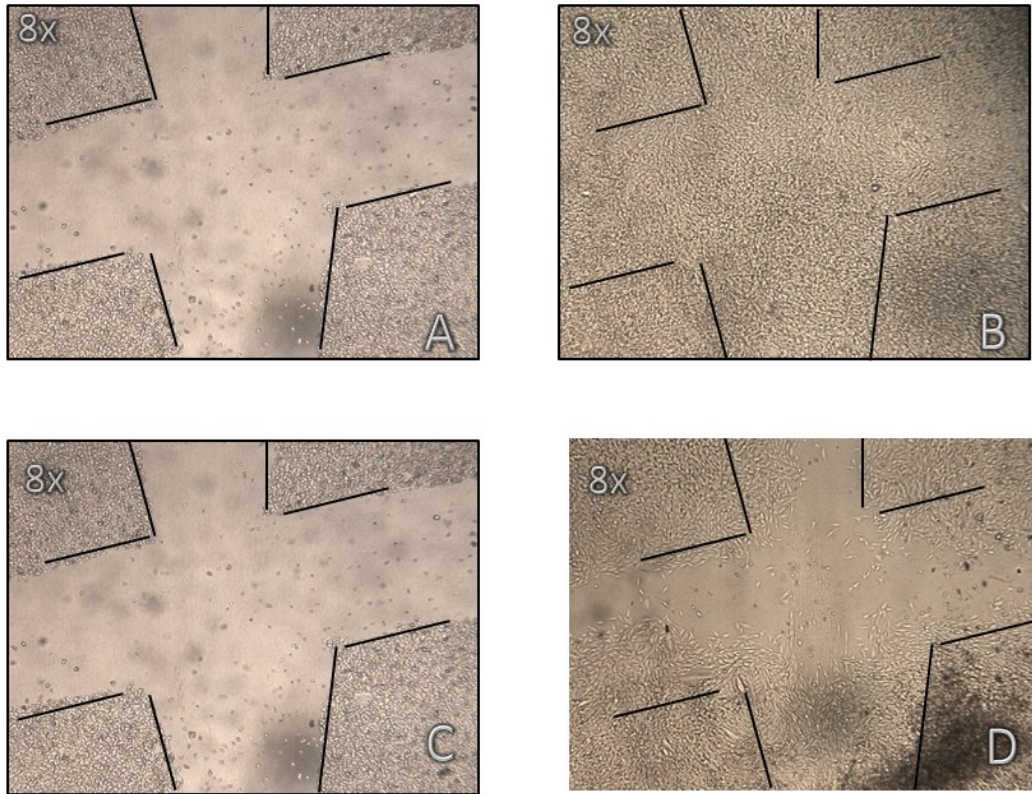


Figura 47 : Scratch test. : A)CTRL T.0 B) CTRL 48h C) "esosomi" brassica D) "esosomi" alfa-alfa

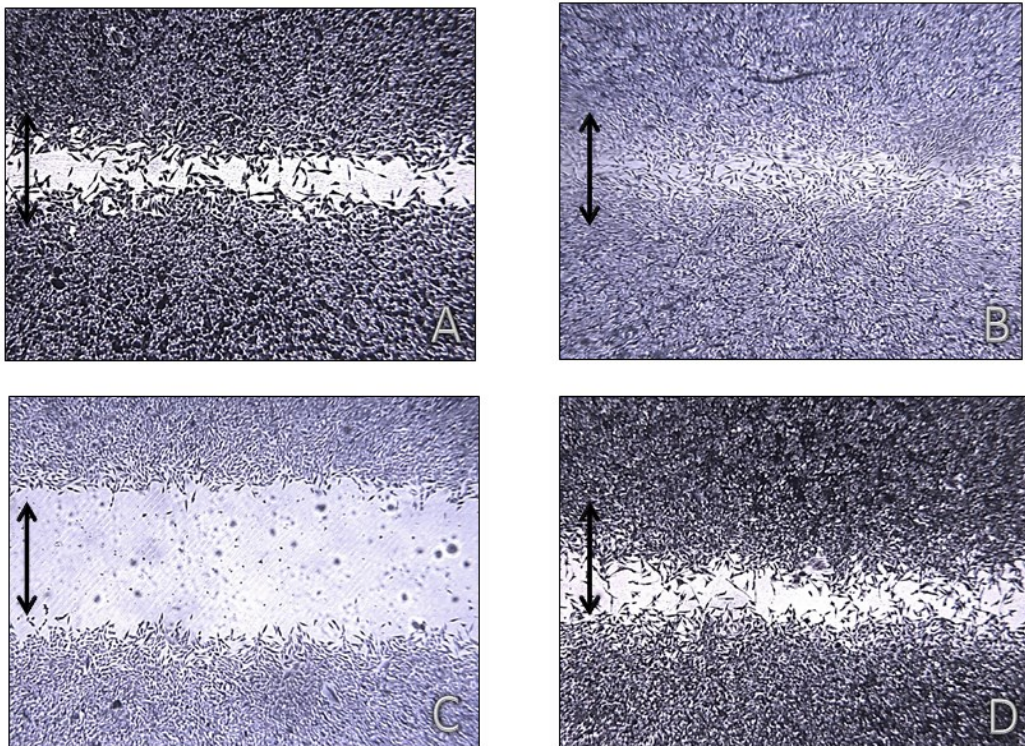


Figura 48 : particolare dello Scratch test - colorazione Giemsa - A) CTRL 24h B) CTRL 48h
C) "Esoomi" brassica 24h D) "Esoomi" brassica 24h wash-out

6. DISCUSSIONI

La diffusione della cultura di un benessere psicofisico globale si è incentrata sempre più sulla sana alimentazione e sul corretto stile di vita, creando un binomio inscindibile alimentazione-salute, che riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento di tale equilibrio.

Le recenti acquisizioni in campo scientifico supportano l'ipotesi che la dieta, oltre a soddisfare il fabbisogno nutrizionale, possa rappresentare una prima linea di difesa, modulare varie funzioni dell'organismo ed essere quindi considerata "funzionale". L'identificazione di cibi che combinano in modo sinergico aspetti nutrizionali ed aspetti medico-farmacologici, ha portato al riconoscimento dell'esistenza di una relazione inversa tra il consumo di questi alimenti e l'insorgenza di malattie cronico-degenerative.

Il preoccupante incremento di eventi patologici ad alta incidenza, dovuti allo stile di vita sedentario e alla dieta squilibrata, principalmente diffusi nei paesi occidentali, ha favorito la diffusione di questa consapevolezza.

La conoscenza delle basi biochimiche delle malattie ha condotto a verificare l'ipotesi di poter regolare le funzioni cellulari e potenziare i sistemi di difesa dell'organismo attraverso composti, nutrienti e non nutrienti, presenti negli alimenti naturali, scoprendo e valorizzandone la componente funzionale.

Intorno agli alimenti ed al concetto di nutrizione si sta verificando una storica metamorfosi che ha come risultato una nuova categoria di prodotti chiamati "functional foods". Sono alimenti in grado di

migliorare lo stato di salute e benessere, capaci di agire sull'organismo modulandone diverse funzioni, riducendo il rischio o ritardando l'insorgenza di gravi patologie come, le malattie cardiovascolari (CVD), malattie infiammatorie croniche, neoplasie .

Per saggiare le proprietà benefiche e salutistiche attribuite ad un alimento, studi che utilizzano modelli sperimentali e trials clinici sono di fondamentale importanza.

Il mio interesse nell'approfondimento dell'attività dei cibi funzionali deriva dalle evidenze scientifiche che li descrivono come buoni agenti antiossidanti, antinfiammatori e di prevenzione nelle patologie neoplastiche.

Lo studio di tali attività, condotto nell'arco del periodo di dottorato, è stato suddiviso in due linee di ricerca che hanno avuto come oggetto rispettivamente *Lycium barbarum* e *Brassica oleracea*.

La scelta di questi due alimenti è stata effettuata per il ruolo di “super foods” che, sin dall'inizio di questo secolo, hanno rivestito nei paesi occidentali.

Le bacche del Goji vengono considerate tra le fonti di cibo naturale più ricche di antiossidanti esistenti sulla Terra. Il loro potere antiossidante raggiunge vette sorprendenti utilizzando il valore di misurazione ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Tali proprietà sono da attribuire ai suoi componenti attivi quali: polifenoli, polisaccaridi e carotenoidi (β - carotene, β - criptoxantina, licopene , zeaxantina).

Il modello da noi utilizzato per saggiare la bioattività del Goji, ha previsto in un campione di 20 soggetti , la somministrazione di 15 bacche/die integrate nelle loro abituali diete, per periodi stabiliti (7gg e 15gg) e intervallati da periodi di wash-out.

Mentre sono innumerevoli gli studi scientifici che hanno confermato l'attività ipoglicemizzante delle bacche di Goji, sono pochi i lavori che hanno preso in esame i loro effetti ipocolesterolemici. Il gruppo di *Qiong Luo et al.*⁶⁶ ha dimostrato nel suo studio che il Lycium non soltanto possiede i significativi effetti ipoglicemici già noti, ma anche effetti ipolipidemici non trascurabili, evidenziati da una diminuzione del colesterolo totale nei conigli diabetici alloxan-indotti.

I modelli animali ben si prestano a questo tipo di analisi sperimentale, dal momento che sono modelli facilmente gestibili nei quali è possibile indurre, tramite opportuni trattamenti, condizioni patologiche e nei quali è possibile somministrare le sostanze in esame per capire i meccanismi di azione e attuare interventi di prevenzione trasferibili e riportabili nell'uomo.

I risultati del nostro studio hanno mostrato una diminuzione dei livelli di colesterolo e di glucosio dopo integrazione del Goji, livelli che tornavano pressoché ai valori iniziali dopo la sospensione di tale alimento (periodo di wash-out), in cui invece tali valori risultano aumentati. La fase di wash-out, in cui si notava la ripresa delle condizioni basali dei parametri chimico-clinici, è servita quindi da controllo al soggetto stesso, che ha comunque seguito una dieta libera e non standardizzata.

Nello studio pilota, 13 dei 20 soggetti presi in esame, hanno mostrato una riduzione dei valori di glicemia; la diminuzione media totale è stata del 2.2%.

Per quanto riguarda i valori di colesterolo si è osservata una diminuzione media del 7%; in 17 soggetti il livello di colesterolo totale si è abbassato in maniera più evidente.

Alla luce dei risultati ottenuti, interessante sarebbe ripetere lo studio individuando soggetti con range di colesterolo alto, non su base genetica, e non sottoposti a terapia farmacologica con statine.

Se i risultati dovessero confermare tale andamento, si potrebbe suggerire a questi soggetti di introdurre nella loro dieta il Goji per aiutare a controllare i livelli di colesterolo.

D'altra parte esistono già in commercio alimenti addizionati con fitosteroli, come ad esempio il DANACOL, un prodotto lanciato nel 2006 dalla Danone, bevanda a base di latte scremato fermentato addizionato con steroli vegetali, destinato a coloro che intendono ridurre i livelli ematici di colesterolo.

È utile anche per i soggetti che seguono la terapia ipocolesterolemizzante, perchè potrebbe portare alla riduzione dei dosaggi di statine, farmaci che devono essere assunti a lungo termine e che non sono privi di effetti collaterali.

Importante sarà comprendere quale tra i composti bioattivi presenti nel Goji sia responsabile del suo effetto ipocolesterolemizzante ed eventualmente se questo è riconducibile all'azione dei fitosteroli stessi, descritti peraltro in letteratura come costituenti chimici del *Lycium barbarum* [Xie C. et al., 2001]⁶⁷, o se tale effetto è da ricercare in altre componenti, senza tralasciare, tra queste, le possibili influenze sul microbiota intestinale.

Il microbiota è infatti un ecosistema complesso caratterizzato da una dinamica e reciproca interazione con l'ospite. La composizione e la concentrazione della popolazione microbica varia nei diversi distretti del tratto intestinale e viene modulata anche dalla dieta dell'individuo. E' risaputo che i componenti bioattivi dei functional foods, previa metabolizzazione da parte del microbiota, vengono resi disponibili all'

assorbimento cellulare. Nell'ambito dello studio pilota con integrazione di bacche di Goji nella dieta, il nostro laboratorio, in passato, ha condotto degli studi sulla caratterizzazione del microbiota dei soggetti arruolati per lo studio.

Mediante l'utilizzo di tecniche di amplificazione basate sulla "tradizionale" *Polymerase Chain Reaction*, per lungo tempo utilizzate per lo studio e l'identificazione in microbiologia, quali ARDRA e RAPD, sono stati ottenuti diversi profili di DNA batterico, che mostravano come il microbiota di ogni soggetto venisse in qualche modo influenzato e di conseguenza modificato.

Essendo lo studio del microbiota intestinale un argomento di attuale interesse nel panorama scientifico internazionale e vista la sua importanza in molteplici processi fisiologici, la ricerca in questo campo ha avuto una rapida ascesa, grazie soprattutto al superamento dei limiti tecnologici della microbiologia classica, giungendo allo sviluppo di piattaforme di sequenziamento di nuova generazione (NGS) che hanno permesso lo studio simultaneo di comunità di microorganismi (metagenomica) ad alta risoluzione. Uno studio, basato su l'utilizzo di tali piattaforme, potrà senz'altro meglio determinare il microbiota ed evidenziare come esso possa variare in base alla tipologia di dieta seguita. [David LA et al. 2014]⁶⁸.

Per tale ragione il DNA estratto dai campioni di feci, raccolte per il nostro studio, è stato conservato a -80°C, con l'idea di utilizzarlo e analizzarlo in un futuro prossimo con le nuove piattaforme, in vista anche dell'attivazione, presso il nostro ateneo, del BRIT (Bio-nanotech Research and Innovation Tower).

Dagli stessi campioni nel lavoro qui descritto è stata estratta l'acqua fecale (FW) , un prodotto bioattivo altamente variabile, in grado di suscitare vari effetti cellulari, tra cui danni al DNA e citotossicità.

L'azione positiva del Goji è stata evidenziata anche dalla diminuzione dell'attività genotossica della Fecal Water, infatti i dati ottenuti dimostrano una variazione in termini di riduzione della tossicità dei campioni di FW post integrazione di Goji.

Tale risultato ottenuto in vitro potrebbe rispecchiare in vivo una migliore condizione del lume intestinale. Vi è in progetto l'intenzione di iniziare un trial allargando lo studio su soggetti con patologie infiammatorie croniche intestinali (IBD); a tal proposito stiamo pianificando il lavoro anche attraverso la collaborazione di gastroenterologi e il reclutamento dei pazienti.

Certamente è da sottolineare che questo tipo di studio è volto esclusivamente a indagare sull'esistenza di una modulazione del microbiota, che è comunque strettamente correlato alle abitudini alimentari di un individuo e proprio per questo variabile in base ai cibi consumati.

Per tale ragione è possibile valutare gli effetti dell'introduzione di un "nuovo" alimento funzionale nella propria dieta che, seppur variabile, si può considerare comunque stabile.

D'altra parte non è facilmente realizzabile l'idea di omologare un regime alimentare di diversi soggetti, soprattutto nei casi in cui lo studio richiede di dover assumere giornalmente cibi poco apprezzati per le loro caratteristiche organolettiche o poco graditi per i gusti personali. A questo proposito, durante gli esperimenti relativi alla seconda linea di ricerca, incentrata sulle proprietà di Brassica oleracea, si è verificato che soggetti reclutati per l'assunzione

quotidiana di una quantità fissa di 100gr/die di cavolo nero a crudo, per 15 giorni, abbiano poi deciso di abbandonare lo studio per la difficoltà di tollerare tale regime a lungo termine.

Si potrebbe invece pensare di adottare nuove modalità di somministrazione, più apprezzabili, come ad esempio mediante capsule o succhi formulati a partire dagli estratti degli alimenti funzionali.

Tale tipologia di prodotti commerciali negli ultimi anni trovano largo consenso tra i consumatori, che mostrano ormai una maggiore attenzione e consapevolezza alimentare. Succhi o estratti liofilati di ortaggi a foglia verde, piuttosto che barrette o capsule, possono essere infatti utilizzati per soddisfare le dosi giornaliere raccomandate di fitocomplessi.

La comunità scientifica recentemente ha portato alla “ribalta” il kale juice, succo di Brassica oleracea acefala, uno dei succhi di verdura più consumato in Corea, come fonte ricca di vitamine, flavonoidi e minerali, che si sta affacciando ultimamente anche nel mercato occidentale.

Dopo lo studio di *Park et al*⁶⁹ in Inghilterra su modello in vitro dove si è dimostrato “l’effetto ipocolesterolemizzante dell’estratto di Brassica” sul metabolismo del colesterolo attraverso l’inibizione dell’HMG-CoA, *Soo Yeon Kim et al.*⁷⁰ in Corea in uno studio in vivo, in cui è stato integrato nella dieta dei soggetti il succo di cavolo (150 ml/die per 12 settimane), hanno mostrato sostanziali miglioramenti nei profili sierici dei lipidi, specialmente per quanto riguarda il rapporto dei livelli colesterolo HDL e LDL.

Ancora, lo studio di *Jeong-Hwa Han et al.*⁷¹ ha avuto lo scopo di verificare se l’integrazione giornaliera di succo di cavolo potesse

modulare la pressione sanguigna, i livelli di profili lipidici e di glucosio nel sangue, e se questa modulazione potesse essere influenzata dai polimorfismi GSTM1 e GSTT1 (Glutathione S-Transferase M1 e T1).

I risultati hanno dimostrato che l'assunzione di succo di cavolo influenza la pressione arteriosa, i profili lipidici e di glucosio in pazienti ipertesi in relazione alla presenza di polimorfismi genetici GST.

Dati della letteratura scientifica affermano che piccole quantità di germogli di Cruciferae, dopo tre giorni di germinazione, hanno le stesse sostanze bioattive di grandi quantitativi degli stessi ortaggi adulti; quindi, nel nostro lavoro, si è voluto testare se il succo estratto dai germinelli di Brassica oleracea producesse gli stessi effetti attesi dal succo della pianta adulta. I germinelli, infatti, contengono un quantitativo di GLS fino a 100 volte superiore a quello della pianta adulta e di vitamina C anche 200 volte superiore rispetto al seme. Il meccanismo d'azione che sostiene la funzione nutraceutica è determinato dall'idrolisi attivata dall'enzima mirosinasi che, idrolizzando i GLS, determina la formazione di diversi composti volatili, tra i quali gli isotiocianati. Sono numerosi i lavori scientifici, tra i quali gli studi sul carcinoma della mammella e del colon, in cui è stato riscontrato l'utilizzo di germogli di broccoli. [Fahey et al. 1997]⁵⁷. I germogli di Brassica sono stati anche studiati nella riduzione dell'infezione sostenuta da Helicobacter pylori e quindi nella prevenzione dei tumori gastrici. [Akinori Yanaka, 2005]⁵⁸. Giacché i modelli utilizzati per studiare gli effetti della Brassica sono costituiti da cellule neoplastiche in coltura e poiché viene evidenziata l'azione antineoplastica di tali estratti, nel corso dei nostri studi

abbiamo voluto verificare l'attività del succo di germinelli di Brassica su cellule normali.

Il modello da noi allestito è stato quello dei PBMC (*Peripheral blood mononuclear cell*), nel quale abbiamo notato la riduzione della proliferazione PHA indotta, che evidenziava un'attività antiproliferativa e verosimilmente non antineoplastica.

Abbiamo inoltre notato la presenza di cellule aderenti morfologicamente diverse dai monociti presenti nella piastra di controllo; queste cellule si mostravano allungate come in movimento e con delle protrusioni che ricordano le cellule fagocitiche. Per tale ragione è stato deciso di procedere all'analisi citofluorimetrica dei campioni che ha evidenziato una maggiore espressione del CD14, marcatore specifico della linea macrofagica che fa ipotizzare l'avvenuta attivazione delle cellule.

Tale sperimentazione sta proseguendo al fine di verificare se esiste un'aumentata capacità fagocitica mediante test di fagocitosi con lievito e mediante colorazioni esterasi non-specifiche.

Il mio maggior interesse nell'ultimo periodo di dottorato è stato quello di comprendere i meccanismi alla base degli effetti benefici di Brassica oleracea da noi osservati, ho voluto indagare sui possibili meccanismi di comunicazione tra mondo vegetale ed animale, anche sulla base di recenti lavori in letteratura. A tale scopo ho studiato l'eventuale presenza di microvescicole vegetali che potessero fungere da mezzo di comunicazione in tal senso.

In biologia cellulare, le cellule di organismi procarioti, eucarioti e piante secernono continuamente grandi quantità di microvescicole, esosomi, complessi macromolecolari e piccole molecole nello spazio extracellulare per la comunicazione intercellulare.

La caratteristica che accomuna le diverse classi di vescicole extracellulari è la loro capacità di trasferire proteine, lipidi e acidi nucleici, influenzando così diverse funzioni fisiologiche e patologiche sia delle cellule target che delle loro progenitrici. Negli ultimi anni, lo sviluppo di tecniche per l'analisi delle proteine su larga scala ha permesso ai ricercatori di identificare in dettaglio il tipo di informazione trasportato dagli esosomi [S. Mathivanan]⁶¹.

*Jan Lötvall*⁶² prima e *H. Valadi*⁶² poi, con esperimenti in vitro hanno provato l'esistenza di RNA messaggero e microRNA all'interno di esosomi umani e provato che l'mRNA potrebbe essere tradotto in proteine nelle cellule bersaglio, fornendo così la prima dimostrazione del trasferimento di informazioni genetiche tramite esosomi.

Studi in letteratura hanno suggerito che le vescicole extracellulari riscontrate nelle cellule vegetali possono essere considerate esosomi-simili (*Exosome-like*).

Si può supporre che tali nanoparticelle potrebbero funzionare in una comunicazione interspecie.

*Zhang*⁶³ e colleghi hanno riferito che le particelle derivate da piante commestibili (uva, pompelmo, zenzero e carote) mostrano proprietà anti-infiammatorie nelle malattie gastrointestinali.

Un recente lavoro scientifico di *Raimondo et. al.*⁶⁴ sul Citrus, ha identificato per la prima volta una frazione di vescicole di succo di limone, ed è stato dimostrato, utilizzando un approccio in vitro, che questi "esosomi" isolati inibiscono la proliferazione delle cellule di diverse linee tumorali.

In relazione a questo tipo di ricerche, nel mio studio ho isolato gli "esosomi" da germinelli di Brassica oleracea e ne sono stati saggiati

gli effetti in un sistema di colture cellulari tridimensionali (3D) di cellule tumorali.

La scelta di lavorare su colture 3D è derivata dalle caratteristiche molecolari peculiari di tale sistema, che si discostano dalle quelle delle colture in monostrato, ma che si avvicinano maggiormente all'architettura strutturale del tumore *in vivo*.

Dall'osservazione degli sferoidi trattati con "esosomi" di Brassica si è notato un rallentamento della crescita cellulare, che ha suggerito la presenza di un'attività antiproliferativa delle microvescicole.

L'effetto antiproliferativo degli "esosomi" è stato ulteriormente confermato dai risultati dello Scratch test, con il quale è stato possibile valutare anche un effetto citostatico evidente quando, sostituendo il medium contenente esosomi con normale terreno di coltura, si assisteva alla ripresa della normale proliferazione cellulare.

Tale effetto inibitore riscontrato potrebbe avere un ruolo rilevante nei confronti di quei fenomeni che ben si associano alla capacità metastatica delle linee cellulari tumorali, tra i quali appunto la migrazione.

Da questi risultati è emersa l'esigenza di indagare sul contenuto molecolare delle microvescicole di Brassica oleracea.

È risaputo che tra le molecole contenute negli esosomi sono presenti i miRNA, classe di RNA non codificanti che mediano il silenziamento post-trascrizionale di circa il 30% dei geni nei mammiferi, legandosi alla porzione complementare del gene bersaglio. È stato ampiamente dimostrato che questa classe di RNA è in grado di modulare importanti processi biologici, come la differenziazione, l'apoptosi, la proliferazione, la risposta immunitaria e il mantenimento dell'identità

cellulare e dei tessuti. Inoltre un'alterata regolazione dei miRNA è stata associata al cancro e ad altre malattie.

È stata confermata recentemente la presenza di miRNA esogeni di origine vegetale, principalmente veicolati attraverso esosomi, nel siero e nel plasma dell'uomo e dei mammiferi introdotti negli individui analizzati attraverso l'alimentazione.

*Chen-Yu Zhang et al.*⁷² si sono interessati a MIR168a, microRNA presente nel riso e risultato particolarmente abbondante nel siero degli uomini cinesi analizzati.

Gli studi funzionali in vitro e in vivo condotti hanno dimostrato che MIR168a può legarsi nell'uomo e nel topo all'mRNA che codifica per la proteina LDLRAP1 (low-density lipoprotein receptor adapter protein1) inibendone l'espressione nel fegato e determinando un aumento nel tempo della concentrazione di colesterolo LDL nel sangue di topo. Questi dati indicano che microRNA esogeni di pianta presenti nel cibo, sono in grado di regolare l'espressione di geni bersaglio nei mammiferi.

*Pastrello C. et. al.*⁷³ hanno confermato la presenza dei microRNA vegetali nel sangue umano in un ampio studio nutrigenomico di coorte e in un trial randomizzato dose controllo, individuando una correlazione positiva significativa tra la quantità giornaliera di broccoli consumati e la quantità di microRNA nel sangue. Hanno inoltre dimostrato che questi microRNA regolano l'espressione dei geni umani e proteine in vitro e che collaborano con altre componenti di Brassica in un probabile meccanismo di prevenzione del cancro.

Alla luce di tali evidenze scientifiche, obiettivo futuro è quello di identificare il contenuto molecolare degli "esosomi" da noi isolati dai germinelli di Brassica procedendo con:

- ✓ analisi di espressione tramite miRNA array, sistema per lo studio del profilo d'espressione genetica
- ✓ caratterizzazione proteica.

Al momento si sta procedendo con uno studio in silico (dry lab) consultando alcune banche di miRNA vegetali (<http://rhesus.amu.edu.pl/mirnest/copy/>, <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) per individuare nell'uomo quei miRNA che hanno come target geni coinvolti nei processi di differenziazione, apoptosi e proliferazione cellulare.

Successivamente si procederà a verificarne la presenza negli "esosomi" di Brassica, l'azione sul target individuato, valutarne i meccanismi d'azione su modelli sperimentali per ipotizzarne non solo un possibile utilizzo associato alle convenzionali chemioterapie, ma anche nelle targeted-terapy .

In conclusione l'approfondimento delle proprietà dei composti naturali a livello molecolare e cellulare, ha la potenzialità di permettere di individuare i target farmacologici dei fitocomplessi d'interesse, di valutarne l'attività globale ed aprire una strada per l'identificazione dei biomarker più significativi nella modulazione delle diverse patologie.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Kojima K. The Eastern consumer viewpoint: the experience in Japan. *Nutr Rev* 1996;54: S186-8.
2. Mollet B, Rowland I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 483-5.
3. Slavin JL, Lloyd B. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr*. 2012 Jul 1;3(4):506-16. doi: 10.3945/an.112.002154. Review.
4. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J*. 19, 1602–161 (2005)
5. Izar MCO. Nutrigenomics and nutrigenetics. Future perspectives for disease prevention. *Int J Atheroscler* 2007; 2(3):203-206
6. Kalra EK. Nutraceutical—definition and introduction. *AAPS PharmSci*. 2003;5(3): E25.
7. Arai et al. *Curr Opin Lipidol* 2008, 19: 69-73.
8. Kaput J. Decoding the pyramid: a systems-biological approach to nutrigenomics. *Ann NY Acad Sci*. 2005 Dec; 1055:64-79.
9. Corth'esy-Theulaz I, den Dunnen JT, Ferr'e P, Geurts JM, M'uller M, van Belzen N, van Ommen B. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Ann Nutr Metab*. 2005 Nov-Dec;49(6):355-65.
10. Arai, S. (2005). Perspective on functional food science. *Journal of Science, Food and Agriculture* 85: 1603-1605.

11. Arai, S., Vatter, D.A. and Kumagai, H. (2013). Functional foods- History and Concepts. Book series Functional foods, Nutraceuticals and Natural Products: Concepts and Applications vol. 1 (10.1-10.13.).
12. Arai S: Studies on functional foods in Japan-state of the art. *Biosci Biotechnol Biochem* 60: 9-15, 1996.
13. Corbellini, G. (2012). *Stili alimentari e salute di genere* edizione 1. Franco Angeli Editore, Milano. Capitolo 3 (65-79).
14. Togni, E. (2011). Smart foods and dietary supplements: regulatory and civil liability issues in a comparison between Europe and United States. Law and Technology Research Group, University of Trento. Student paper series number 3: 1-255.
15. Xie Zhufan. 2000. *Practical Traditional Chinese Medicine*. Beijing
16. Dan Bensky: *Chinese Herbal Medicine: Materia Medica*, Third Edition, Sep 2004
17. Li QY: *Healthy Functions and Medicinal Prescriptions of Lycium barbarum. (Gou Ji Zi)*. Jindun Press, Beijing, China 1-16, 2001.
18. Wang CC, Chang SC, Inbaraj BS and Chen BH (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.*, 120: 184-192.
19. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010 Oct;1(1):15-31.
20. Donatella Pietraforte. Free radicals, oxidative stress and health. Istituto Superiore di Sanità 2005, iii, 126 p. *Rapporti ISTISAN* 05/40.
21. Van't Veer P, Jansen MC, Klerk M, Kok FJ. Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.* 2000 Mar;3(1):103-7. Review. PubMed PMID: 10786730.
22. Luo Q, Yan J, Zhang S. [Isolation and purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and its antifatigue effect]. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2000 Mar 30;29(2):115-7. Chinese. PubMed PMID: 12725093.

23. Chia Chi Wang, Shyh Chung Chang, Bing Huei Chen. Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus. *Food Chemistry* 116 (2009) 595–603
24. Li X., Zhou A., Evaluation of the antioxidant effects of polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*. *Med. Chem. Res.*, 2007, 15, 471–482.
25. Mao F, Xiao B, Jiang Z, Zhao J, Huang X, Guo J: Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med Oncol* 28:121-6, 2011.
26. Piao M, Murata Y, Zhu B, Shimoishi Y, Tada M (2005) Changes in carotenoid content and its composition during maturation of *Fructus lycii* fruits. *Jpn J Food Chem* 12:5–39
27. Weller P, Breithaupt DE. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2003 Nov 19;51(24):7044-9. PubMed PMID: 14611169.
28. E. O. Iwalewa, L. J. McGaw, V. Naidoo and J. N. Eloff Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (25), pp. 2868-2885, 28 December, 2007
29. Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 2002 Apr 26;296(5568):695-8. PubMed PMID: 11976443.
30. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol.* 2011 Jan;12(1):5-9. doi: 10.1038/ni0111-5. PubMed PMID: 21169997.

31. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF, Patterson PH, Mazmanian SK. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013 Dec 19;155(7):1451-63. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.024. PubMed PMID: 24315484; PubMed Central PMCID: PMC3897394.
32. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem*. 2002 Dec 4;50(25):7449-54. PubMed PMID:12452674.
33. Weisburger JH. Lifestyle, health and disease prevention: the underlying mechanisms. *Eur J Cancer Prev*. 2002 Aug;11 Suppl 2: S1-7. Review. PubMed PMID:12570328.
34. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog*. 2006 Jan-Feb;22(1):186-98. Review. PubMed PMID: 16454510.
35. Pedras MS, Yaya EE. Phytoalexins from Brassicaceae: news from the front. *Phytochemistry*. 2010 Aug;71(11-12):1191-7. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.020. Review. PubMed PMID: 20416910.
36. Velasco P, Francisco M, Moreno DA, Ferreres F, García-Viguera C, Cartea ME. Phytochemical fingerprinting of vegetable Brassica oleracea and Brassica napus by simultaneous identification of glucosinolates and phenolics. *Phytochem Anal*. 2011 Mar-Apr;22(2):144-52. doi: 10.1002/pca.1259. PubMed PMID: 21259374.
37. Finley JW. The antioxidant responsive element (ARE) may explain the protective effects of cruciferous vegetables on cancer. *Nutr Rev*. 2003 Jul;61(7):250-4. Review. PubMed PMID: 12918878.
38. Zhang Y, Tang L. Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacol Sin*. 2007; 28:1343–1354.

39. Juge N, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:1105–1127
40. Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* 2008, 52(Suppl 1): S128– S138.
41. Lee JS, Surh YJ. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* 2005, 224:171–184
42. Jeffery EH, Keck AS. Translating knowledge generated by epidemiological and in vitro studies into dietary cancer prevention. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52 (Suppl 1): S7–S17.
43. Myzak MC, Dashwood RH. Chemoprotection by sulforaphane: keep one eye beyond Keap1. *Cancer Lett.* 2006, 233:208–218.
44. Müller M, Kersten S. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 315-321
45. Melega S, Canistro D, Pagnotta E, Iori R, Sapone A, Paolini M. Effect of sprout extract from Tuscan black cabbage on xenobiotic-metabolizing and antioxidant enzymes in rat liver. *Mutat Res.* 2013 Feb 18;751(1): 45-51. doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.10.013.
46. Fimognari C, Ferruzzi L, Turrini E, Carulli G, Lenzi M, Hrelia P, Cantelli-Forti G. Metabolic and toxicological considerations of botanicals in anticancer therapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012 Jul;8(7): 819-32.
47. Fimognari C, Turrini E, Ferruzzi L, Lenzi M, Hrelia P. Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutat Res.* 2012 Apr-Jun;750(2):107-31.
48. Christen et al. *Chimia (Aarau)* 2012, 66: 320-3.
49. Holst B, Williamson G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep.* 2004 Jun;21(3):425-47.

50. Mukherjee S, Lekli I, Ray D, Gangopadhyay H, Raychaudhuri U, Das DK. Comparison of the protective effects of steamed and cooked broccolis on ischaemia-reperfusion-induced cardiac injury. *Br J Nutr.* 2010 Mar.
51. London SJ, Yuan JM, Chung FL, et al. Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet.* 2000, 356:724–729.
52. Spitz MR, Duphorne CM, Detry MA, et al. Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000, 9:1017–1020
53. Wang LI, Giovannucci EL, Hunter D, et al. Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control.* 2004, 15:977–985.
54. Cheney G. Rapid healing of peptic ulcers in patients receiving fresh cabbage juice. *Calif Med.* 1949 Jan;70(1):10-5.
55. Suido H, Tanaka T, Tabei T, Takeuchi A, Okita M, Kishimoto T, Kasayama S, Higashino K. A mixed green vegetable and fruit beverage decreased the serum level of low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic patients. *J Agric Food Chem.* 2002 May 22;50(11):3346-50.
56. Gasper AV, Al-Janobi A, Smith JA, et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82:1283–1291.
57. Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16;94(19):10367-72.

58. Yanaka A, Fahey JW, Fukumoto A, Nakayama M, Inoue S, Zhang S, Tauchi M, Suzuki H, Hyodo I, Yamamoto M. Dietary sulforaphane-rich broccoli sprouts reduce colonization and attenuate gastritis in *Helicobacter pylori*-infected mice and humans. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009 Apr;2(4):353-60.
59. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987 Jul 5;262(19):9412-20.
60. Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis*. 2005 May-Jun;34(3):214-9.
61. S. Mathivanan, R.J. Simpson, "ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA," *Proteomics*, 9:4997-5000, 2009.
62. H. Valadi et al., "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells," *Nat Cell Biol*, 9:654-59, 2007.
63. Zhang M, Viennois E, Xu C, Merlin D: Plant derived edible nanoparticles as a new therapeutic approach against diseases.;4(2): e1134415, 2016.
64. Raimondo S, Naselli F, Fontana S, Monteleone F, Lo Dico A, Saieva L, Zito G, Flugy A, Manno M, Di Bella MA, De Leo G, Alessandro R. Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget*. 2015 Aug 14;6(23):19514-27.
65. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids". *Curr Protoc Cell Biol*. 2006 Apr.
66. Q Luo, Y Cai, J Yan, M Sun, H Corke. - Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum* - Life sciences, 2004 – Elsevier.

67. Xie C, Xu LZ, Li XM, Li KM, Zhao BH, Yang SL., Studies on chemical constituents in fruit of *Lycium barbarum*. 2001 May;26(5):323-4. Chinese. PubMed PMID: 12528521.
68. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23;505(7484):559-63.
69. Park J R, Park J C, Choi S H (1997). Screening and characterization of anticholesterogenic substances from edible plant extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26, 236-241.
70. Kim SY, Yoon S, Kwon SM, Park KS, Lee-Kim YC. Kale juice improves coronary artery disease risk factors in hypercholesterolemic men. *Biomed Environ Sci*. 2008 Apr;21(2):91-7.
71. Jeong-Hwa Han, Hye-Jin Lee, Tae-Seok Kim, and Myung-Hee Kang. The effect of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms on blood pressure, blood glucose, and lipid profiles following the supplementation of kale (*Brassica oleracea acephala*) juice in South Korean subclinical hypertensive patients. *Nutr Res Pract*. 2015 Feb;9(1):49-56.
72. Zhang L, Hou D, Chen X, et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 2012;22:107-26.
73. Pastrello C, Tsay M, McQuaid R, Abovsky M, Pasini E, Shirdel E, Angeli M, Tokar T, Jamnik J, Kotlyar M, Jurisicova A, Kotsopoulos J, El Sohemy A, Jurisica I. Circulating plant miRNAs can regulate human gene expression in vitro. *Sci Rep*. 2016 Sep 8;6:32773. PMC5015063.

Altre fonti:

- i. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- ii. https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=it
- iii. <http://rhesus.amu.edu.pl/mirnest/copy/>
- iv. <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>
- v. <http://www.proteinatlas.org/>