

Progetto NUTRIGEA-Valorizzazione della qualità nutrizionale di germogli per uso alimentare

Coordinatore scientifico Dr. Giorgio Morelli

Relazione tecnico-scientifica

Il progetto, originariamente di durata biennale, ha subito numerosi ritardi che hanno portato alla richiesta di proroghe poi concesse dal MiPAAF. I ritardi inizialmente sono stati dovuti all'esecuzione dei lavori di messa a norma dell'INRAN che hanno richiesto due anni. I lavori hanno comportato il trasferimento in containers dei laboratori destinati alla realizzazione delle attività progettuali, con conseguente forte rallentamento delle attività scientifiche. Anche l'acquisto della nuova strumentazione finanziata dal progetto ha subito ritardi, data la difficoltà di collocazione delle nuove apparecchiature, con conseguente modifica dei programmi di realizzazione degli esperimenti previsti tempi. A partire dal 2011, la grande sofferenza finanziaria nel bilancio dell'INRAN, i provvedimenti normativi riguardanti il contenimento della spesa pubblica, e la successiva soppressione dell'INRAN hanno reso difficoltoso procedere con gli impegni su alcune delle voci previste nell'ambito del budget assegnato per la realizzazione del progetto. L'esigua disponibilità di liquidità nel periodo successivo alla soppressione dell'Ente fino alla completa incorporazione nel C.R.A. ha comportato un ulteriore rallentamento e ulteriori ricadute pratiche sullo svolgimento di alcune linee sperimentali.

Le problematiche di cui sopra hanno portato alla richiesta di una rimodulazione finanziaria per trasferire parte dei fondi dalle varie voci di costo a quella per il personale interno. Questo spostamento di risorse ha comunque lasciato impregiudicati molti degli obiettivi attesi dallo svolgimento dell'attività di tre workpackages di cui si compone il progetto:

- WP1 Identificazione di fattori ambientali in grado di potenziare il contenuto di sostanze salutistiche (bioattive) nei germogli. (Responsabile Dr.ssa Simona Baima)
- WP2 Caratterizzazione chimica dei germogli di Brassicaceae e cresciuti in assenza e presenza di stress ambientale. (Responsabile Dr.ssa Cristina Scaccini.)
- WP3 Valutazione degli effetti biologici dei germogli in studi in vivo ed in vitro. (Responsabile Dr.ssa Yula Sambuy.)

Mentre, per tutti i motivi esposti, non sono state svolte le attività relative alla caratterizzazione dei germogli di *Fabaceae* e gli studi sull'uomo, per contro, è stato messo a punto un sistema per la produzione di un succo acquoso di germogli di broccoli, una matrice alimentare complessa.

Attualmente, la ricerca in nutrizione tende a sottolineare l'importanza di valutare le interazioni tra le numerose molecole che compongono alimenti, per quanto riguarda i loro effetti sulla fisiopatologia del corpo umano. Il succo proveniente da germogli cresciuti in condizioni ambientali normali o modificate è stato utilizzato, dopo opportuna sterilizzazione, sia su colture cellulari che su animali modello, ed è potenzialmente utilizzabile per studi in vivo sull'uomo. Lo sviluppo di questa matrice ha permesso di stabilire collaborazioni con gruppi di ricerca esterni all'Ente per valutare l'effetto dei succhi su sistemi cellulari e animali, collaborazioni che hanno portato alla produzione di lavori scientifici e alla presentazione dei risultati a congressi nazionali e internazionali. Una parte delle attività in collaborazione è ancora in corso.

Di seguito sono riassunti i principali risultati scientifici ottenuti nei tre workpackages.

WP1 Identificazione di fattori ambientali in grado di potenziare il contenuto di sostanze salutistiche (bioattive) nei germogli

Le piante accumulano composti polifenolici in risposta a stress di vario genere, biotici e abiotici. Diverse di queste molecole, assunte durante la dieta dall'uomo, sono state mostrate essere in grado di interagire con l'organismo modulandone i processi fisiopatologici. Queste molecole bioattive sono state spesso messe in evidenza per il loro potere antiossidante, come ad esempio catechina, epicatechina, quercetina, resveratrolo. Quest'ultimo, un composto fenolico non flavonoide prodotto da un numero limitato di specie vegetali, ha destato molto interesse perché in grado di inibire l'ossidazione del colesterolo LDL, nonché l'aggregazione piastrinica e parallelamente ridurre il livello di colesterolo e dei trigliceridi. Infine, può indurre un effetto vasodilatatore del sistema arterioso. L'assunzione di questo potente antiossidante è stata associata quindi alla riduzione del rischio di insorgenza di malattie quali l'aterosclerosi. Sono state avviate attività per comprendere se sia possibile ottenere dati altrettanto significativi utilizzando miscele di antiossidanti o direttamente alimenti.

Attività sui germogli di *Arabidopsis*

Negli ultimi anni, diversi lavori si sono focalizzati sulla messa a punto di strategie biotecnologiche per aumentare le qualità nutrizionali di prodotti di origine vegetale, ad esempio aumentando il contenuto in polifenoli. Riguardo all'ingegneria metabolica, che in maniera classica tenta di manipolare *pathway* metabolici attraverso modificazioni degli enzimi coinvolti, ha negli ultimi anni preso piede un nuovo approccio, che riguarda l'uso dei fattori di trascrizione (TF) per manipolare i livelli dei metaboliti. Evidenze recenti suggeriscono che nelle piante, molto più che negli animali, il metabolismo sia controllato in modo significativo al livello dell'espressione genica. L'uso dei TF nell'ingegneria metabolica degli organismi vegetali sembra essere quindi una soluzione attraente poiché questi sono in grado di influenzare passaggi multipli all'interno delle vie metaboliche; infatti, la regolazione globale dei processi di espressione genica è organizzata nelle piante in *network* gerarchici dove un ristretto numero di TF controlla a cascata un gran numero di processi metabolici a valle. Benché, dal punto di vista della capacità predittiva, sia quindi molto più utile andare ad operare sui TF più in alto nel livello di controllo trascrizionale, un altro fattore da considerare a livello di influenza di un TF su una determinata via metabolica è quello della conservazione evolutiva del *pathway* in diverse specie. A livello pratico, interessanti risultati sono stati ottenuti sui *pathway* dei composti fenolici: un lavoro recente ha mostrato come si possa deviare



la via metabolica delle antocianine verso la produzione specifica di tannini mediante co-espressione del TF PAPI (che controlla a monte tutto il *pathway* delle antocianine) e dell'enzima antocianidin reductasi (ANR).

La strategia con cui si sono portati avanti progetti di ingegneria metabolica in questi anni è passata spesso attraverso la costruzione di organismi geneticamente modificati: attualmente però questo tipo di approccio non appare più molto proficuo, alla luce dell'estrema complessità della legislazione in materia e delle forti diffidenze di molta parte dell'opinione pubblica europea. In realtà la nuova tecnica del *genome editing* apre nuove prospettive per la modifica di interi pathways metabolici. Nuove strategie per manipolare i livelli di espressione genica di fattori di trascrizione operanti nel controllo del metabolismo secondario, come PAPI, possono essere sviluppati a partire da studi di base sulla fisiologia delle piante: è noto che molti metaboliti secondari siano prodotti dalle piante in risposta a condizioni ambientali che provocano un aumento dell'attività metabolica. Tra queste vi è sicuramente la qualità della luce che circonda la pianta, che è un parametro molto importante per il suo sviluppo in quanto dalla luce le piante traggono l'energia vitale di cui necessitano attraverso la fotosintesi. Quando vengono a trovarsi in una condizione luminosa sub-ottimale [ad esempio in caso di ombreggiatura reciproca, come in condizioni di coltura intensiva; basso rapporto *Red(R)/Far-Red(FR)* della luce ambientale], molte angiosperme mettono in atto una risposta, denominata "Fuga dall'ombra", per cercare di raggiungere la luce ottimale. Questa strategia evolutiva ha fatto sì che la pianta fosse in grado di ottimizzare in maniera efficiente le sue risorse energetiche a seconda dell'ambiente di crescita.

Per studiare questo importante processo fisiologico e i suoi effetti sulla produzione di metaboliti secondari dalla pianta sul sistema modello *Arabidopsis* si sono analizzati i cambiamenti globali di espressione genica provocati da questa condizione di basso R/FR. A questo scopo è stata utilizzata la tecnologia del *DNA microarray GeneChip® Affymetrix* (Santa Clara, CA), che permette di analizzare contemporaneamente l'espressione della quasi totalità dei circa 25000 geni codificati nel genoma di *Arabidopsis*, pianta modello delle angiosperme. Per l'analisi bioinformatica dei dati ottenuti dai microarray sono stati poi utilizzati diversi *software*, tra cui GeneSpring (Agilent Technologies), e R (www.bioconductor.org) e diversi strumenti presenti in internet, come Mapman (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>) e Genevestigator (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>).

Analisi precedenti condotte nei nostri laboratori avevano già mostrato che un numero significativo di geni coinvolti in vie metaboliche secondarie mostrava una repressione durante un trattamento prolungato con una luce avente basso rapporto R/FR. Tra questi, una forte regolazione era a carico di geni presenti nella biosintesi degli antociani, facendo supporre una riduzione di questi composti mediata dalla qualità luminosa. Inoltre un buon numero di questi geni, tra cui *TT3*, *TT19*, *ANS homologue*, *UGT75C1*, *UGT79B1* e *At3g29590*, era stato mostrato essere regolato dal fattore di trascrizione *PAPI*, il quale era a sua volta consistentemente represso dal basso R/FR. Lavori recenti hanno dimostrato che il saccarosio è capace di indurre l'accumulo di antociani in *Arabidopsis* in modo *PAPI*-dipendente. Quindi lo spegnimento dei geni per la biosintesi degli antociani potrebbe essere una conseguenza di una riduzione del metabolismo primario. Un'altra interessante ipotesi viene dal fatto che la riduzione degli antociani sia accoppiata ad un concomitante aumento del contenuto dei flavonoidi; questi ultimi sono dei ben noti intermedi della via biosintetica delle antocianine, e sono stati mostrati giocare un ruolo importante nella modulazione del trasporto polare auxinico. Consistentemente con questa ipotesi, mentre tutti i geni per la biosintesi delle antocianine trovati repressi dalla luce con un basso R/FR codificano per





enzimi agenti a valle dello *step* di produzione dei flavonoidi nella via metabolica, sono indotti i geni codificanti per enzimi a monte del medesimo passaggio, come *CHI* e *CHS*.

Per approfondire le variazioni globali di espressione genica nelle piante durante l'esposizione a condizioni di luce sub-ottimali, sono stati effettuati trattamenti prolungati con luce a basso R/FR, per 1 e 4 giorni su germogli di *Arabidopsis*. Per caratterizzare i cambiamenti metabolici provocati da questo regime luminoso sub-ottimale, è stato utilizzato il *software* bioinformatico Mapman (MPIMPP/RZPD, Germany). Diversi geni coinvolti nel metabolismo secondario sono stati individuati come significativamente regolati dopo 1 giorno di trattamento: l'effetto più evidente è stato osservato a carico della biosintesi degli antociani/flavonoidi, evidenziando un'induzione dell'espressione di diversi tra questi geni. Dopo un giorno di esposizione alla luce con un basso R/FR, infatti, *TT4/AtCHS*, *TT6/F3H*, *FLS*, *UGT84A2*, *UGT78D2/UFGT* vengono significativamente indotti. L'analisi dei diversi esperimenti *GeneChip Affymetrix* ha però mostrato che questi cambiamenti metabolici hanno una regolazione dinamica nel tempo. Infatti, la modulazione delle differenti diramazioni della via degli antociani/flavonoidi a tempi diversi di trattamento suggerisce che ad una repressione della biosintesi degli antociani sia accoppiato un aumento dei flavonoidi, supportando l'ipotesi vista precedentemente. Infatti, i geni codificanti per enzimi agenti a monte della produzione dei flavonoidi, *TT4/AtCHS*, *TT6/F3H*, *FLS*, risultano indotti significativamente con un picco dopo 1 giorno che è quasi scomparso in corrispondenza del prolungamento del trattamento (4 giorni). Diversamente, dopo un trattamento di 4 giorni con una luce arricchita nel basso R/FR tutti i geni coinvolti nella biosintesi degli antociani quali *TT3/DFR*, *AtGSTF12/GST26/TT19*, *ANS homologue*, *UGT75C1*, *UGT79B1* e *At3g29590*, codificanti enzimi agenti a valle della diramazione della via metabolica per la produzione dei flavonoidi, risultano sotto-espressi. In più, la contemporanea riduzione dell'espressione di *PAP1* suggerisce che la repressione della via degli antociani possa avvenire in maniera *PAP1*-dipendente, che potrebbe essere consequenziale ai bassi livelli di saccarosio sperimentati dalla pianta in queste condizioni luminose.

I più recenti risultati di genomica funzionale emersi nella comunità scientifica hanno dimostrato la conservazione di gran parte della via metabolica dei flavonoidi nelle piante dicotiledoni, a partire da *Arabidopsis* passando per il pioppo fino alla vite. L'ingegneria metabolica del *pathway* *PAP1*-dipendente ha quindi tutte le premesse per costituire un'ottima strategia di miglioramento di tutta una serie di produzioni agro-industriali, ottimizzando la produzione di composti ad alto valore nutraceutico agendo semplicemente sulle sue condizioni di crescita.

I cambiamenti della qualità della luce ambientale (basso R/FR) sono percepiti dalla pianta attraverso il sistema dei fitocromi. Come primo passo per identificare la cascata di segnalazione implicata nella induzione di geni codificanti enzimi che agiscono a monte della produzione di flavonoidi, sono stati caratterizzati mutanti del fitocromo A (*phyA*) dopo esposizione a luce con basso rapporto R/FR. I mutanti *phyA* mostrano una risposta esagerata alla luce con basso R/FR: sono estremamente allungati e la crescita della foglia è significativamente ridotta rispetto a germogli wild type. Esperimenti di analisi quantitativa dell'espressione genica (RT-qPCR) hanno evidenziato che geni codificanti enzimi che agiscono a monte della produzione di flavonoidi, quali *TT4/AtCHS*, *TT6/F3H*, *FLS*, non sono indotti in mutanti *phyA* dopo esposizione a luce con basso R/FR. L'insieme dei dati ha suggerito che *phyA* possa giocare un ruolo chiave nella overproduzione di flavonoidi in seguito ad esposizione delle piante a luce con basso rapporto R/FR.



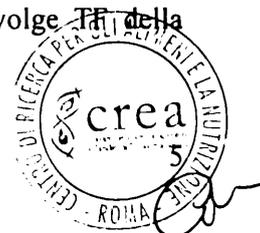


Per indagare le variazioni globali di espressione genica nelle piante *phyA* indotte da luce con basso R/FR, sono stati condotti esperimenti di *DNA microarray* (*GeneChip® Affymetrix*; Santa Clara, CA). A tale scopo, l'RNA è stato estratto da germogli wild type e mutanti *phyA* cresciuti 7 giorni in un ambiente luminoso con alto rapporto R/FR, e poi o mantenuti nello stesso regime luminoso o esposti a luce con basso R/FR per 1 giorno. Per l'analisi bioinformatica dei dati ottenuti dai *microarray* sono stati utilizzati diversi *software*, tra cui GeneSpring (Agilent Technologies) e R (www.bioconductor.org) e diversi strumenti presenti in internet, come Mapman (gabi.rzpd.de/projects/MapMan/) e Genevestigator (www.genevestigator.ethz.ch). Le analisi hanno evidenziato che un alto numero di geni è differenzialmente regolato nel wild type rispetto al mutante *phyA* e viceversa. Uno degli effetti maggiori è stato osservato per la biosintesi dei flavonoidi. Infatti, dopo 1 giorno di esposizione a luce con basso R/FR, *TT4/AtCHS*, *TT6/F3H*, *FLS*, *UGT84A2*, *UGT78D2/UFGT* sono tutti significativamente indotti nel wild type ma non nel mutante *phyA*.

L'analisi dei dati *microarray* ha anche mostrato che il gene codificante il fattore di trascrizione bZip HY5 è indotto nel wild type e non nel mutante *phyA* in risposta a luce con basso R/FR. HY5 è stato mostrato precedentemente agire a valle della segnalazione del fitocromo A ed interagire direttamente *in vivo* con il promotore del gene *TT4/AtCHS*. Esperimenti di RT-qPCR condotti nel wild type e nel mutante *hy5* esposti a luce con basso R/FR per tempi diversi hanno evidenziato che l'induzione del gene *TT4/AtCHS* dipende dall'attività del fattore di trascrizione HY5. Analisi cinetiche hanno anche mostrato che l'induzione di *HY5* precede quella di *TT4/AtCHS*. L'analisi dei dati di *microarray* di germogli wild type e mutanti *phyA* esposti a luce arricchita nella componente FR per 1 giorno e gli esperimenti di cinetica di induzione in germogli wild type e mutanti *hy5* hanno identificato *phyA* ed HY5 come molecole chiave per l'overproduzione di flavonoidi indotta dalla luce con basso rapporto R/FR.

Il ruolo del fattore di trascrizione HY5 e del suo omologo HYH nella regolazione della biosintesi dei flavonoidi in piante esposte a luce arricchita nella componente FR è stato ulteriormente indagato. A questo scopo, germogli wild type, *phyA*, *hy5* and *hy5 hyh* sono stati cresciuti per 7 giorni in luce con un alto rapporto R/FR e poi o mantenuti in alto R/FR o esposti a luce con basso R/FR per 1, 2, 4, 8, 12, 20, 21, 22 and 24 ore. Esperimenti di RT-qPCR hanno evidenziato che anche il gene *HYH* è indotto da luce con basso R/FR in modo *phyA*-dipendente e che HY5 ed HYH funzionano in modo ridondante nell'induzione di geni codificanti enzimi che agiscono a monte della produzione di flavonoidi. In conclusione, i risultati ottenuti hanno evidenziato un circuito regolativo (*phyA*, HY5, HYH) implicato nella induzione di flavonoidi nella pianta in risposta a variazioni della qualità della luce ambientale.

Sono stati anche compiuti degli studi sul pathway di biosintesi delle poliammine. Alcuni dati della letteratura suggeriscono che le poliammine potrebbero agire come molecole di stress primordiali dai batteri ai mammiferi, e potrebbero svolgere un ruolo essenziale nella regolazione dell'interazione ospite-patogeno. Inoltre, svolgono un ruolo importante nella prevenzione delle allergie nei bambini, soprattutto nella regolazione dell'assorbimento cibo-allergene da parte dell'intestino. Infine influenzano l'immunità innata e acquisita. Durante lo studio della biosintesi delle poliammine in *Arabidopsis* abbiamo individuato un meccanismo attraverso cui la termospermina regola il differenziamento vascolare attraverso un complesso circuito regolativo che coinvolge TF della famiglia HD-ZIP III e l'auxina.



Infine, sono stati compiuti studi di germinazione in *Arabidopsis* in presenza di sale con lo scopo di valutare la possibilità di utilizzo per l'induzione di sostanze prodotte dal metabolismo secondario. Durante questo lavoro è stato approfondito il ruolo dei TF TZF 1-5. I dati raccolti hanno permesso di stabilire che queste proteine sono conservate evolutivamente, dalle briofite alle piante superiori. La conservazione evolutiva è mantenuta anche a livello di espressione genica essendo i relativi geni TZF regolati dal sale, suggerendo che la funzione di regolazione della germinazione in presenza di sale nelle piante superiori si sia evoluta a partire da pathways di segnalazione in risposta al sale che controllano crescita e sviluppo di piante primitive.

Attività sui germogli di broccolo

Sono state messe a punto le condizioni per la crescita di germogli di cavolo broccolo (*Brassica oleracea* var. *botrytis cymosa*) mediante colture idroponiche in ambiente controllato (celle climatiche). In particolare sono stati utilizzati dei germogliatori dotati di un tamburo rotante che consente l'irrigazione periodica dei germogli evitando però un eccessivo ristagno di acqua a contatto con le plantule. Sono state quindi condotte delle cinetiche di crescita in condizioni di buio, luce continua e cicli giorno/notte con 16 ore di luce e 8 ore di buio a temperatura costante di 21 °C raccogliendo i germogli a 3, 5, 7 e 10 giorni dalla messa in coltura. Successivamente è stato analizzato l'effetto dell'intensità luminosa (17 o 110 mmol m⁻² s⁻¹) in germogli di 3 giorni cresciuti con cicli di 16 ore di luce e 8 di buio a 21 °C costanti o con una temperatura di 29 °C di giorno e 16 °C di notte. Sono stati in seguito condotti alcuni esperimenti per valutare l'effetto dello stress idrico e salino e di alcune molecole segnale coinvolte nelle risposte da stress nelle piante. In particolare germogli di 3 giorni sono stati incubati per due giorni prima della raccolta in presenza di diverse concentrazioni di NaCl (10, 50, 100 mM), saccarosio (88 e 176 mM), mannitolo (88 e 176 mM), acido salicilico (250 e 750 µM), acido metil-jasmonico (30 e 300 µM) e ACC (precursore dell'ormone etilene) (50 e 500 µM). Tutti i campioni prodotti sono stati analizzati dal punto di vista morfologico per esaminare l'effetto delle diverse condizioni di crescita sullo sviluppo delle plantule prima del congelamento in azoto liquido e la conservazione a -80 °C. I campioni congelati sono stati poi polverizzati con il Waring Blendor raffreddato in azoto liquido e aliquote sono state distribuite ai diversi gruppi per l'attività analitica.

È stato anche valutato l'effetto della luce UV-B sull'accumulo di glucosinolati ed antociani. In particolare germogli di 3 giorni cresciuti in coltura idroponica a 21 °C con cicli giorno/notte di 16 ore di luce e 8 ore di buio sono stati irradiati con luce UV-B per diversi tempi (da 20' a 8 h) e poi lasciati crescere nelle condizioni iniziali per altri 2 giorni prima della raccolta. L'analisi morfologica dei campioni prima del congelamento in azoto liquido ha mostrato una lieve riduzione dell'accrescimento delle plantule nei germogli trattati con luce UV-B per almeno 2 h mentre non era visibile alcun cambiamento di colore indicativo di un cambiamento della sintesi di antociani. I campioni congelati conservati a -80 °C sono stati poi polverizzati con il Waring Blendor raffreddato in azoto liquido, aliquotati e resi disponibili per l'attività analitica.

In seguito all'analisi dei risultati alcuni campioni di germogli sono stati scelti per effettuare un'analisi globale dei piccoli RNA allo scopo di identificare quali di questi sono espressi in modo differenziale nelle diverse condizioni di stress esaminate e quali potrebbero avere un ruolo regolativo nella attivazione/repressione di vie metaboliche rilevanti ai fini dell'arricchimento funzionale dei germogli. Inoltre, poiché è stato riportato che miRNA di origine vegetale possono essere trasportati dal lume intestinale al circolo sanguigno e che, almeno in un caso specifico,





questo può influenzare la regolazione dell'espressione genica dell'animale, la conoscenza dei miRNA presenti nei germogli di broccoli potrebbe essere rilevante ai fini salutistici. La frazione di small RNA è stata estratta da 10 campioni (buio, luce, NaCl 100 mM, saccarosio 176 mM, mannitolo 176 mM, glucosio 6%, SA 750 uM, MeJA 30 uM, MeJA 300 uM, ACC 500 uM) ed analizzata attraverso Next generation sequencing (indicare parametri rilevanti). L'analisi dei risultati non è ancora stata conclusa.

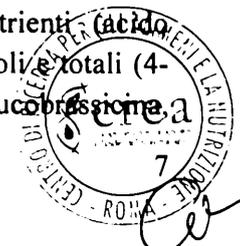
Durante lo sviluppo dell'attività sperimentale del WP3 relativa allo studio degli effetti sulle colture cellulari, è stata evidenziata la necessità di disporre di un materiale di consistenza omogenea ma che riflettesse il più fedelmente possibile la composizione dei germogli. Poiché il tessuto polverizzato nel mezzo di coltura dà origine ad una sospensione disomogenea e l'uso di miscele di solventi per la produzione di estratti porta inevitabilmente all'arricchimento di alcune classi di molecole e alla perdita di altre, è stato deciso di utilizzare il succo ottenuto dalla spremitura dei germogli freschi mediante un estrattore a pressa. Il tipo di estrattore scelto consente di ottenere il succo molto rapidamente e senza surriscaldamento, condizioni necessarie per mantenere il più possibile inalterati i metaboliti contenuti nei germogli. Il succo grezzo ottenuto dalla spremitura è stato centrifugato per eliminare i residui particolati e insolubili e le diverse frazioni (germogli intatti, residuo secco, succo grezzo, succo centrifugato, pellet) sono state raccolte per l'analisi metabolica per verificare l'efficacia del processo di estrazione e la presenza delle molecole d'interesse nel succo centrifugato. Lo stesso procedimento è stato applicato anche a germogli sottoposti, prima dell'estrazione del succo, ad un breve trattamento di denaturazione delle proteine (1 minuto in microne, potenza 850 W) per eliminare alcune attività enzimatiche responsabili della conversione e della perdita di metaboliti d'interesse (e abbattere un'eventuale contaminazione batterica dei germogli).

Dopo la messa a punto delle condizioni di preparazione del succo, è stata avviata la produzione di succo centrifugato da germogli di 5 giorni cresciuti al buio (condizione basale) o alla luce, con o senza la presenza di saccarosio per 2 giorni (condizione arricchita in glucosinolati e antocianine). Al termine della preparazione il succo è stato immediatamente aliquotato e conservato a -80 °C in attesa della caratterizzazione della composizione e dell'attività biologica. Diversi lotti di succo sono stati preparati a partire da germogli ottenuti da crescite indipendenti sia per verificare la riproducibilità dei dati che per assicurare la produzione di materiale sufficiente per l'attività di ricerca sugli effetti biologici del succo e dell'arricchimento in diversi tipi di sistemi modello (vedere WP3).

WP2 Caratterizzazione chimica dei germogli di Brassicaceae e cresciuti in assenza e presenza di stress ambientale

Per prima cosa sono state messe a punto metodiche di HPLC MS per caratterizzare il glucosinoloma di germogli di *Brassica*. Sono state inoltre sviluppate metodiche per la valutazione dei polifenoli totali e dei flavonoidi, dell'attività antiossidante totale, delle vitamine C, E e del beta-carotene, ed un metodo per la determinazione quantitativa di singoli acidi fenolici in utilizzando la cromatografia liquida in HPLC con rivelatore a diodi. Sono stati quindi analizzati i germogli cresciuti in diverse condizioni ambientali e sottoposti a diversi tipi di stress (vedi WP1).

La caratterizzazione ha riguardato la misura della concentrazione di micronutrienti (acido ascorbico, tocoferolo, carotenoidi), di polifenoli, flavonoidi totali, glucosinolati singoli e totali (4-metossiglucobrassicina, neoglucobrassicina, 4-idrossiglucobrassicina, glucobrassicina).



glucocheirolina, glucorafanina, glucoiberina, glucoerucina, glucoiberverina, gluconapoleiferina, progoitrina/epiprogoitrina, gluconapina, sinigrina e glucoalisina) e della capacità antiossidante totale (TEAC e FRAP).

Confronto luce/buio

Nei germogli cresciuti alla luce, il contenuto in polifenoli e flavonoidi totali, beta carotene e glucosinolati è significativamente più alto rispetto ai germogli cresciuti al buio. Nessuna differenza qualitativa nel pattern di glucosinolati è stata rivelata tra germogli cresciuti alla luce e germogli cresciuti al buio. La glucorafanina rappresenta il glucosinolato più abbondante (quasi il 50% del totale), seguito da glucoiberina ($\approx 9\%$), glucoerucina ($\approx 8\%$), 4-idrossigluco Brassicina ($\approx 7\%$), gluconapoleiferina ($\approx 6\%$) and 4-metossigluco Brassicina ($\approx 4\%$) (i rimanenti glucosinolati rappresentano solo il 2%).

Buio, luce continua, luce alternata in un ciclo notte/giorno e effetto del periodo di sviluppo (da 3 a 10 gg di crescita)

La tipologia della luce (continua o alternata) non ha un effetto significativo sul contenuto in polifenoli, flavonoidi, beta-carotene e glucosinolati (stante che per entrambe le condizioni di luce il contenuto degli analiti misurati è sempre maggiore rispetto ai germogli cresciuti al buio). Inoltre polifenoli, flavonoidi e quasi tutti i glucosinolati diminuiscono durante il periodo di sviluppo, sia in condizioni di buio che di luce. Comportamento opposto è stato rilevato nel caso del beta-carotene.

Regime di Temperatura (21°C e ciclo 29/16C°) e intensità della luce

Il ciclo di temperatura 29/16C° determina un aumento statisticamente significativo nel contenuto in polifenoli, flavonoidi e glucosinolati totali. Invece, l'intensità della luce non sembra avere una grande influenza sul contenuto in glucosinolati.

Stress abiotici, chimici e ormonali

Sono stati studiati germogli cresciuti per 3 gg e poi sottoposti per 2gg a diverse condizioni di stress; le condizioni stressanti erano: NaCl, Saccarosio, Mannitolo, Acido Salicilico, Acido Metil Jasmonato, Acido Carbossilico Aminociclopropano.

Tra le varie condizioni di stress testate solo il saccarosio e il mannitolo erano in grado di indurre un aumento significativo della concentrazione di glucosinolati totali rispetto al controllo. Anche i singoli glucosinolati rispondevano in maniera diversa ai vari stress: mentre quasi tutti i glucosinolati erano indotti da saccarosio, mannitolo, e ACA, l'incubazione con acido salicilico induceva un aumento rispetto al controllo solo di gluconapoleiferina, glucoalisina e 4-metossigluco Brassicina e l'incubazione con MeJa induceva un aumento della concentrazione di neogluco Brassicina e gluco Brassicina. Per quanto riguarda polifenoli totali e flavonoidi totali, i loro pattern di modifica rispetto al controllo erano simili, e le loro concentrazioni erano aumentate da mannitolo, saccarosio, ACA ed acido salicilico. Solo il trattamento con il saccarosio induceva un aumento significativo di vitamina C. Sia saccarosio che mannitolo inducevano una diminuzione nella concentrazione di beta carotene, mentre la concentrazione aumentava dopo trattamento con ACA, acido salicilico e MeJa. La Principal Component Analysis, ha permesso di suddividere i vari trattamenti in gruppi, sulla base della varianza osservata.



La caratterizzazione dei succhi di germogli descritti in WP1 per lo studio *in vitro* in un sistema cellulare (vedi WP 3) è stata effettuata mediante metabolomica untargeted. I risultati hanno mostrato che i profili metabolici dei due succhi ottenuti da germogli coltivati in differenti condizioni ambientali (basali ed arricchiti) erano significativamente differenti ($p < 0.0001$). Analisi mirate di polifenoli totali, flavonoidi totali, antocianine totali e il contenuto di glucosinolati, hanno dimostrato che le antocianine erano la frazione di composti fenolici la cui concentrazione aumentava particolarmente dopo trattamento. I 14 glucosinolati analizzati erano sotto il livello di rilevazione in entrambi i succhi, probabilmente a causa della attivazione, nel corso della preparazione, della mirosinasi, enzima che favorisce la conversione dei glucosinolati in isotiocianati. Una caratterizzazione approfondita mediante analisi LC-MS targeted ha permesso l'identificazione di 18 composti fenolici e 14 antocianine responsabili per il maggiore arricchimento in molecole bioattive del succo arricchito rispetto al controllo.

WP3 Valutazione degli effetti biologici dei germogli in studi *in vivo* e *in vitro*.

Linea 1 - Studi *in vivo*.

Per meglio programmare gli studi *in vivo* su volontari umani sani, è stata prima preparata una rassegna approfondita della letteratura relativa agli effetti del consumo di Brassicacee sulla salute umana. Si è poi sviluppato il protocollo per lo studio acuto *in vivo* che è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Sapienza. Purtroppo lo studio non è poi stato compiuto per l'impossibilità di programmare le spese relative al personale esterno necessario per la sperimentazione.

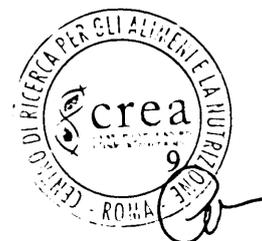
Linea 2 - Studi *in vitro*.

La valutazione della qualità nutrizionale e dei potenziali effetti benefici sulla salute di un alimento di origine vegetale è particolarmente difficile da ottenere. Per questo motivo, uno degli scopi del progetto è stato di mettere a punto dei modelli *in vitro* e animali sui quali poter saggiare gli effetti biologici con potenziali ricadute sulla salute umana, di alimenti vegetali arricchiti con molecole bioattive.

Analisi microbiologica dei succhi

Le analisi microbiologiche dei succhi non filtrati hanno evidenziato la presenza di microrganismi (carica batterica totale, lieviti e muffe, *Enterobacteriaceae*) in concentrazioni superiori ai limiti previsti dal Reg. CE 2073/2005, indicando la necessità di un trattamento di risanamento prima di destinarli al consumo umano.

Per verificare l'attività antimicrobica i succhi provenienti da germogli cresciuti al buio, alla luce, o alla luce + saccarosio (vedi WP1) sono stati saggiati mediante il metodo dell'antagonismo diretto in piastra coltivando i microrganismi indicatori patogeni più comunemente rinvenuti nei prodotti alimentari (*Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* appartenenti a 6 diverse serovar). L'assenza di un alone di inibizione della crescita in prossimità dello spot di succo di germoglio considerato, non ha segnalato la presenza di alcuna attività antagonistica nei confronti dei ceppi indicatori utilizzati.



È stata inoltre condotta una lavorazione sperimentale di yogurt con aggiunta di succhi in volumi diversi (1, 5, 10 ml). Le caratteristiche del prodotto finale (consistenza del coagulo, quantità di siero, pH) e la cinetica di crescita dei microrganismi tecnologici starter per la produzione dello yogurt (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) non sono state alterate dalla presenza dei succhi di broccolo. Il titolo dei microrganismi si è mantenuto costante durante il periodo di conservazione del prodotto a 14 gg, mentre diminuiva di 1 solo log UFC/ml dopo 32 giorni dalla fine della lavorazione.

In conclusione i succhi prodotti non possono essere utilizzati per alimentazione umana senza un previo trattamento di risanamento (filtrazione, omogenizzazione o altro) per la presenza di microrganismi. Inoltre, essi non mostrano possedere proprietà antimicrobiche contro alcuni principali patogeni alimentari. Tuttavia è stato possibile produrre degli yogurt contenenti diverse quantità di succhi con caratteristiche inalterate e mantenimento della carica batterica degli starter. Questi risultati indicano la possibilità di produrre yogurt per uso alimentare umano le cui caratteristiche organolettiche andrebbero ulteriormente analizzate.

Modello intestinale sotto stress ossidativo

Come primo bersaglio e barriera d'ingresso dell'alimento è stato scelto un modello *in vitro* della barriera intestinale, la linea di cellule intestinali umane differenziate Caco-2, capace di riprodurre in coltura molte delle caratteristiche dell'enterocita maturo.

Cellule Caco-2 differenziate e trattate con Fe(II) ascorbato per indurre stress sono state utilizzate per valutare l'attività di estratti di germogli di cavolo broccolo cresciuti in condizioni ambientali tali da ottenere un diverso arricchimento in molecole bioattive (vedi WP1 e WP2). Inizialmente è stato utilizzato un estratto idroalcolico di germogli (cresciuti in condizioni di luce). Il saggio ha evidenziato un effetto di potenziamento della tossicità da parte di estratti di germogli con mirosinasi endogena disattivata, mentre quelli con mirosinasi attiva non sono risultati tossici ma non hanno neppure mostrato attività protettiva del danno ossidativo. Si è quindi deciso di proseguire gli studi utilizzando succhi di germogli freschi pressati a freddo (vedi WP1) nel tentativo di preservare tutte le forme bioattive dei germogli. Per prima cosa è stata verificata la tossicità dei succhi su cellule Caco-2 differenziate per stabilire la dose massima che non inducesse alterazioni al monostrato cellulare. Dosi non-tossiche di succo di germogli cresciuti per 5 giorni al buio (condizione basale) o alla luce per 5 giorni con aggiunta di saccarosio negli ultimi 2 giorni (condizione arricchita in glucosinolati e antocianine) sono state utilizzate per trattare cellule Caco-2 sottoposte a stress ossidativo. Gli esperimenti hanno evidenziato un potenziamento della tossicità da stress ossidativo di entrambi i succhi (indipendentemente dall'arricchimento in molecole bioattive). Questo risultato ha quindi confermato i risultati ottenuti sugli estratti idroalcolici. Sullo stesso modello è stato anche saggiato l'effetto del sulforafano purificato, principale isotiocianato presente nei preparati di germoglio utilizzati. Il sulforafano, a concentrazioni più basse (5-10 μ M), pur non potenziando il danno ossidativo, non ha mostrato attività protettiva, mentre a concentrazione di 50 μ M è risultato tossico. In conclusione, i succhi di germogli di broccoli, come anche il sulforafano ad alta concentrazione (50 μ M), sembrano potenziare lo stress ossidativo indotto dal trattamento di cellule Caco-2 differenziate con Fe(II), indipendentemente dall'arricchimento in alcune classi di molecole bioattive.



Modello di co-coltura di cellule intestinali e epatiche

Un altro approccio per valutare gli effetti dei germogli di broccolo arricchiti è stato l'utilizzo di un modello di co-coltura di cellule intestinali ed epatiche, in precedenza messo a punto per lo studio del trasporto e metabolismo dei retinoidi. L'effetto dell'isotiocianato sulforafano è stato inizialmente valutato separatamente sulle due linee cellulari: la linea intestinale Caco-2 e la linea di epatociti differenziati HepaRG isolata da epatoma umano. In seguito al trattamento con sulforafano si è osservata in entrambi i tipi cellulari, un aumento della traslocazione nucleare concentrazione-dipendente della proteina Nrf2, fattore di trascrizione che regola l'espressione di importanti proteine coinvolte nella risposta allo stress ossidativo, e l'aumento della proteina gamma-glutamilsintetasi catalitica (gamma-GCSc), un enzima che regola la biosintesi del glutatione, la cui trascrizione è regolata da Nrf2. Nelle cellule epatiche trattate con sulforafano si è osservata anche l'induzione della traslocazione nucleare di p65 (subunità del fattore di trascrizione NFkB) accompagnata da una riduzione dei livelli proteici del citocromo CYP3A4, da esso trascrizionalmente regolato. Mettendo in coltura i due citotipi, l'aggiunta al mezzo apicale delle cellule intestinali Caco-2 di succo di germoglio arricchito (luce + saccarosio), ha prodotto nelle sottostanti cellule epatiche HepaRG l'induzione dei fattori di trascrizione NFkB e Nrf2 e l'alterazione dei livelli di alcune proteine citoplasmatiche, con induzione di gamma-GCSc, regolata da Nrf2 e riduzione di CYP3A4, regolata negativamente da NFkB. In conclusione, benchè molto preliminari, questi risultati mostrano che l'utilizzo di modelli cellulari intestinali ed epatici in co-coltura rappresenta un nuovo approccio allo studio delle interazioni tra trasporto e metabolismo di molecole bioattive contenute in alimenti con caratteristiche funzionali.

Modello intestinale sotto stress infiammatorio

Per verificare le potenziali proprietà anti-infiammatorie dei succhi di germogli di broccolo è stata utilizzata la linea di cellule intestinali umane differenziate Caco-2 sottoposta a carenza marginale di zinco e trattata con citochina pro-infiammatoria TNF- α . Come precedentemente da noi dimostrato, in queste condizioni le cellule Caco-2 mostrano alterazioni nella permeabilità del monostrato cellulare e vanno rapidamente incontro a morte cellulare per apoptosi. Le cellule Caco-2 sono state pre-trattate con succhi ottenuti da germogli cresciuti al buio (condizione basale) o alla luce in presenza di saccarosio (condizione di arricchimento), prima di indurre la carenza di zinco e applicare lo stimolo pro-infiammatorio, per verificare l'eventuale attività protettiva dei succhi. Gli esperimenti hanno dimostrato che i succhi sono in grado di ridurre i danni alla barriera intestinale causati dallo stimolo infiammatorio applicato e che questo effetto protettivo è concentrazione dipendente. Il confronto degli effetti protettivi dei due succhi ha inoltre indicato un grado di protezione maggiore per il succo arricchito in molecole bioattive rispetto al succo basale ottenuto da germogli cresciuti al buio. Per verificare la riproducibilità dell'effetto biologico dei succhi, sono stati confrontati tre lotti per ogni condizione, ottenuti da crescite indipendenti di germogli. I tre lotti di succhi hanno confermato gli effetti protettivi sul danno infiammatorio e la maggior efficacia dei succhi arricchiti rispetto a quelli basali. La coltivazione di germogli in condizioni di crescita controllate permette quindi di produrre matrici alimentari vegetali con composizione costante che determina effetti biologici riproducibili.

L'iniziale analisi chimica dei succhi ottenuti da germogli cresciuti in condizioni di buio o di luce + saccarosio aveva mostrato, oltre agli alti livelli del principale isotiocianato dei broccoli, il sulforafano, anche significative differenze nel contenuto di alcune classi di polifenoli.

La caratterizzazione approfondita mediante analisi LC-MS targeted dei succhi condotta nel WP2 ha



permesso di mettere in relazione la composizione in composti fenolici dei diversi succhi con il loro effetto protettivo sulle cellule intestinali sotto stress infiammatorio. L'analisi di regressione multivariata ha mostrato come il livello di protezione fosse correlato con la composizione dei succhi in molecole bioattive, individuando un'associazione significativa tra l'effetto protettivo anti-infiammatorio e un gruppo di composti fenolici, tra cui molte antocianine, la quercetina-3-glicosato, alcuni acidi clorogenici e l'acido cinnamico. Questa analisi non ha invece rilevato un ruolo significativo del sulforafano, di cui sono noti numerosi effetti biologici, nella protezione anti-infiammatoria nelle cellule intestinali. A conferma di questo, esperimenti condotti con sulforafano purificato non hanno mostrato effetti protettivi di questa molecola sul danno indotto nelle cellule intestinali dallo stimolo infiammatorio.

Poiché i danni causati nelle cellule Caco-2 dalla carenza marginale di zinco seguita da trattamento con TNF- α sono principalmente dovuti a morte per apoptosi, sono stati saggiati gli effetti dei succhi di germoglio sull'apoptosi, valutata sia con tecniche di morfologia a fluorescenza, sia con saggi enzimatici. Negli esperimenti di microscopia a fluorescenza sono state visualizzate le cellule in apoptosi mediante un anticorpo specifico e la colorazione dei nuclei. E' stata inoltre analizzata per immunofluorescenza la distribuzione delle proteine che formano le giunzioni inter-cellulari che sono coinvolte nel mantenimento della barriera intestinale. Mentre lo stimolo infiammatorio ha provocato la comparsa di un elevato numero di cellule apoptotiche con disorganizzazione della localizzazione delle proteine delle giunzioni inter-cellulari, nelle cellule trattate con succo di germoglio arricchito le cellule apoptotiche sono fortemente ridotte, la morfologia cellulare è ben conservata e le proteine delle giunzioni cellulari sono correttamente distribuite alla periferia della cellula. Per una valutazione quantitativa di questo effetto è stato utilizzato il saggio enzimatico della caspasi-3, un enzima attivato nel processo apoptotico. La misura dell'attività di caspasi-3 ha confermato la riduzione del processo apoptotico nelle cellule pre-trattate con succo rispetto ai controlli.

I risultati ottenuti indicano che i germogli di Brassica possiedono, almeno in vitro, proprietà anti-infiammatorie e che il modello intestinale in vitro qui presentato si è dimostrato un valido strumento per evidenziare l'azione biologica protettiva dei diversi succhi prodotti nel WP1.

Studi su ipertensione su un modello ratto e su cellule renali

(in collaborazione con il gruppo Rubattu/Volpe, Università Sapienza Roma)

Lo studio ha utilizzato un modello animale, il ratto iperteso (SPSHR) che sviluppa infarto a livello renale in seguito a somministrazione di una dieta ricca in sodio, e due linee di cellule renali. E' stato dimostrato che l'estratto di broccoli arricchito protegge completamente il ratto alimentato con una dieta ricca in sodio e gli effetti osservati sono indipendenti dalla pressione sanguigna elevata. Un aspetto chiave dello studio è che il beneficio a carico dei reni da parte dell'estratto di broccoli avviene attraverso l'attivazione della via chinasi AMP - SIRT 1 deacetilasi - proteina UCP2 che determina la riduzione dello stress ossidativo all'interno del rene.

Studi su un modello cellulare di malattia di Alzheimer

(in collaborazione con il gruppo Donini/D'Erme, Università Sapienza Roma)

Anche se fino ad oggi numerose testimonianze sostengono il ruolo neuroprotettivo dei singoli, sostanze fitochimiche broccoli purificati, pochi studi hanno preso in considerazione i potenziali effetti protettivi di matrici complesse di molecole bioattive contenute nei broccoli. In questo lavoro



sono stati utilizzati i succhi di germogli di broccoli cresciuti in due condizioni, cioè, al buio o esposta alla luce bianca in presenza di saccarosio. Succhi ottenuti dalla spremitura a freddo dei germogli sono stati quindi dosati per la loro capacità antiossidante e per la loro capacità di agire come possibili agenti neuroprotettivi in un modello cellulare di AD, cioè cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y trattate con il 25-35 frammento del beta-amiloide (A β 25-35), uno dei frammenti più tossici della lunghezza completa A β 1-42. In particolare, è stato verificato se germogli di broccoli succhi possano attenuare la citotossicità A β 25-35-indotta e la morte delle cellule stimolando la capacità di difesa antiossidante attraverso l'attivazione di NF-E2-correlato fattore 2 (Nrf2) e la successiva espressione di enzimi di detossificazione antiossidanti e di fase II che giocano un ruolo chiave nel contrastare i danni ossidativi.

Modello *Caenorabitis elegans* per lo studio dell'atrofia muscolare spinale

(in collaborazione con il gruppo Di Schiavi, IBBR-CNR Napoli)

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia neuromuscolare ed una delle cause genetiche più comuni di mortalità infantile. La malattia è caratterizzata da una degenerazione selettiva di neuroni motori inferiori del midollo spinale, che porta ad atrofia muscolare progressiva e morte. SMA è causata da mutazioni del gene di sopravvivenza del motoneurone, SMN1, che è ubiquitariamente espresso. Sebbene le basi genetiche della SMA siano state ampiamente studiate, è ancora non noto come l'assenza di SMN1 induca la degenerazione selettiva dei motoneuroni, e quali siano i meccanismi molecolari alla base della malattia. In *C. elegans* sono stati sviluppati due modelli di SMA da approcci genetici classici: SMN-1 (ok355), un mutante nullo in cui la perdita di SMN-1 produce fenotipi pleiotropici e letalità, e il SMN-1 (cb131) mutante hypomorphic che mostra difetti simili, ma più lievi. Al fine di trovare molecole con un ruolo protettivo di sostanze naturali contro la neurodegenerazione causata da SMN-1, è stato utilizzato un modello genetico in cui SMN-1 viene ridotto e in cui motoneuroni GABAergici presentano una neurodegenerazione età-dipendente, che si traduce in movimento alterato all'indietro e nella morte delle cellule neuronali.

In particolare, per le attività di questo progetto, sono stati testati tre estratti ottenuti da piante cresciute in differenti regimi luminosi (buio, luce) e di osmolarità (terreno arricchito o meno con saccarosio), al fine di valutare l'influenza della luce e dello stress osmotico sulla produzione di molecole bioattive. Abbiamo valutato gli effetti di tali estratti sul processo neurodegenerativo associato al modello SMA, utilizzando diverse diluizioni (1:10, 1:50, 1:100). Le diluizioni 1:50 e 1:100 sono risultate inefficaci, mentre con la diluizione 1:10 i tre estratti presentano un marcato e promettente effetto neuroprotettivo che si traduce nella riduzione significativa del numero di morti neuronali. Tale effetto sembra però essere indipendente dal regime luminoso o di stress osmotico adottato per la crescita delle piante.

Inoltre sono stati analizzati gli estratti anche su vermi wild-type per studiare e rilevare eventuali effetti di tossicità generale. A tal fine abbiamo eseguito degli esperimenti che ci hanno permesso di evidenziare la capacità dei tre estratti di determinare ad entrambe le diluizioni (1:10 e 1:100) una significativa accelerazione del tasso di crescita del nematode, se comparato al regolare tasso di crescita di vermi wild-type in seguito ad esposizione al controllo negativo. In particolare l'estratto da piante cresciute alla luce con terreno arricchito è il responsabile dell'effetto più marcato.



Publicazioni

Baima S, V Forte, M Possenti, A Peñalosa, G Leoni, S Salvi, B Felici, Ruberti I, Morelli G (2014). Negative feedback regulation of auxin signaling by ATHB8/ACL5–BUD2 transcription module. *Mol. Plant* 7, 1006-1025

Ciolfi A, Sessa G, Sassi M, Possenti M, Salvucci S, Carabelli M, Morelli G and Ruberti I. (2013) Dynamics of the shade avoidance response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* 163, 331-353.

D'Orso F, AM De Leonardis, S Salvi, A Gadaleta, I Ruberti, L Cattivelli, Morelli G (2015) Conservation of AtTZF1, AtTZF2 and AtTZF3 homolog gene regulation by salt stress in evolutionarily distant plant species. *Front Plant Sci* 6, 394 16/06/2015 <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00394>

Ferruzza S, Natella F, Ranaldi G, Murgia C, Rossi C, Trost K, Mattivi F, Nardini M, Maldini M, Giusti AM, Moneta E, Scaccini C, Sambuy Y, Morelli G, Baima S. (2016) Nutraceutical improvement increases the protective activity of broccoli sprouts juice in a human intestinal cell model of gut inflammation. *Pharmaceuticals*, vol. 9, ISSN: 1424-8247, doi: 10.3390/ph9030048

Maldini, M.T., Baima, S., Morelli, G., Scaccini, C., e Natella, F. (2012). A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry approach to study "glucosinoloma" in broccoli sprouts. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(9):1198-206.

Maldini M T, Natella F, Baima S, Morelli G, Scaccini C, Langridge J, Astarita G. (2015). Untargeted Metabolomics Reveals Predominant Alterations in Lipid Metabolism Following Light Exposure in Broccoli Sprouts. *Int J Mol Sci.* 16, 13678-13691. PMID: 26084047

Masci A, R Mattioli, P Costantino, S Baima, G Morelli, P Punzi, C Giordano, et al. (2015). Neuroprotective effect of Brassica oleracea sprouts crude juice in a cellular model of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015 Article ID 781938, 17 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/781938>

Natella F, Maldini M, Nardini M, Azzini E, Foddai MS, Giusti AM, Baima S, Morelli G, Scaccini C. (2016) Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. *Food Chem.* 201, 101-109.

Possenti M, Baima S, Raffo A, Durazzo A, Giusti AM, and Natella F. (2016) Glucosinolates in food. J.-M. Mérillon, K.G. Ramawat (eds.), *Glucosinolates, Reference Series in Phytochemistry*, DOI 10.1007/978-3-319-26479-0_4-1

Rubattu S, S Di Castro, M Cotugno, F Bianchi, R Mattioli, S Baima, Morelli G, et al. (2015) Protective effects of Brassica oleracea sprouts extract toward renal damage in high-salt-fed SHRSP: role of AMPK/PPARα/UCP2 axis. *J. Hypert* 33, 1465-1479

Turchi L, Carabelli M, Ruzza V, Possenti M, Sassi M, Peñalosa A, Sessa G, Salvi S, Forte V, Morelli G and Ruberti I (2013) *Arabidopsis* HD-Zip II transcription factors control embryo development and meristem function. *Development* 140: 2118-2129

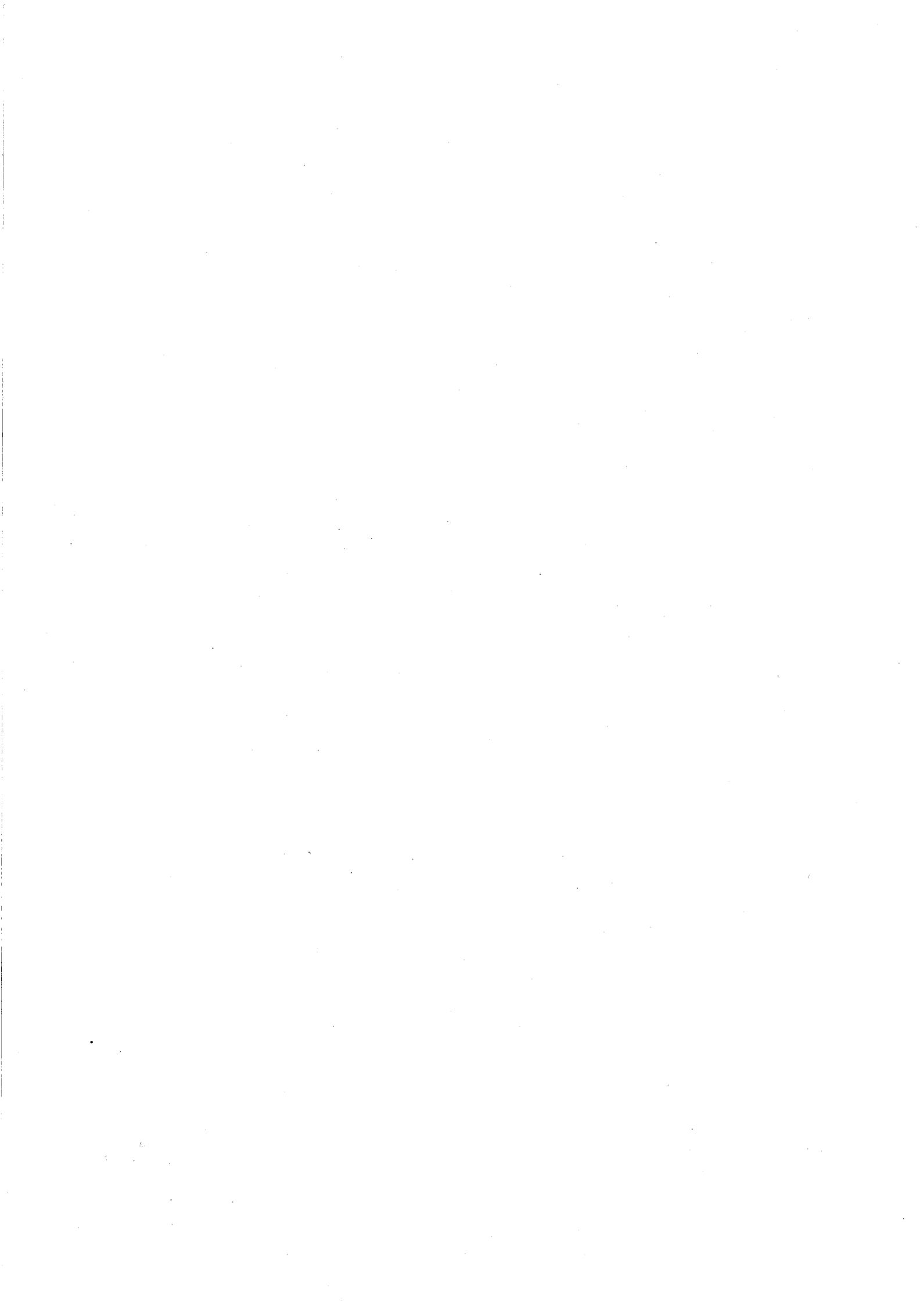
Tesi di Dottorato

Rossi C. (2014) Study of the effects of bioactive compounds in Brassicaceae sprouts on human intestinal and hepatic cell lines. Tesi di Dottorato in Biologia Cellulare e Molecolare. XXVI ciclo. Università degli Studi dell'Aquila.

Convegni

Astarita G., Maldini M., Baima S., Natella F., Scaccini S., Langridge J. "Metabolomics of broccoli sprouts using UPLC with ion mobility MSE" 3rd Mass Spectrometry Food Day, Trento, 9 – 11 ottobre 2013





Baima S., Maldini M., Natella F., Giusti A.M., Scaccini S., Morelli G. "Improvement of broccoli sprouts nutritional value through manipulation of growth conditions". (Comunicazione orale) Proceedings of the 56th Italian Society of Agricultural Genetics (SIGA) Annual congress, Perugia, 17-20 settembre 2012.

Baima S., Maldini M., Natella F., Giusti A.M., Scaccini S., Morelli G. "Nutritional enhancement of broccoli sprouts through manipulation of growth conditions". 6th International symposium on Brassica and 18th Crucifer genetics workshop, Catania, 12-16 novembre 2012.

Baima S., Maldini M., Natella F., Giusti A.M., Azzini E., Foddai S., Maiani G., Ferruzza S., Ranaldi G., Murgia C., Sambuy Y., Scaccini S., Morelli G. "A broccoli sprouts model system for the assessment of improved crop nutritional value". Proceedings of the 57th Italian Society of Agricultural Genetics (SIGA) Annual congress, Foggia, 16-19 settembre 2013.

Baima S., Natella F., Maldini M., Nardini M., Giusti A., Trost K., Mattivi F., Scaccini C., Ferruzza S., Ranaldi G., Rossi C., Murgia C., Sambuy Y., Morelli G., "From broccoli seeds to *in vitro* assay of biological effects: a pipeline for nutritional quality evaluation". 1st IMEKOFODS "Promoting Objective and Measurable Food Quality & Safety", Roma, 12-15 ottobre 2014.

Giusti A.M., Maldini M., Baima S., Natella F., Scaccini S. "Growth conditions and abiotic factors affect final concentration of bioactive compounds in broccoli sprouts". Oxidants and antioxidants in biology meeting, Oxygen Club of California, Alba (CN), 20-23 giugno 2012.

Maldini M., Natella F., Baima S., Scaccini S. "Studio quali-quantitativo 'glucosinoloma-oriented' di germogli di broccoli sottoposti a diversi stress di crescita". Congresso della Società Italiana di Fitochimica (SIF), Roma, 30 giugno - 2 luglio 2011.

Maldini M., Natella F., Baima S., Scaccini S. "Looking for growth conditions that improve 'glucosinoloma' of broccoli sprouts". Nutrigenomics Organization (NuGO) Week 2011, Wageningen (Paesi Bassi), 6-9 settembre 2011.

Maldini M., Natella F., Baima S., Scaccini S. "Looking for growth conditions that improve 'glucosinoloma' of broccoli sprouts to enhance their antioxidant capacity". Second International Conference on 'Environmental stressors in biology and medicine', Siena, 5-7 ottobre 2011.

Maldini M., Natella F., Baima S., Scaccini S. "Looking for growth conditions that improve 'glucosinoloma' of broccoli sprouts". 2nd Mass Spectrometry Food Day, Trieste, 19-21 ottobre 2011.

Maldini M., Baima S., Morelli G., Scaccini S., Natella F. "Dalla pianta al succo. I germogli di broccoli come fonte di glucosinolati e sulforafano". Scuola di Fitochimica 'P. Ceccherelli', Società Italiana di Fitochimica, Paestum (SA), 5-7 ottobre 2012.

Maldini M., Giusti A.M., Baima S., Morelli G., Scaccini S., Natella F. "Screening growth conditions to increase anthocyanins and glucosinolates content in broccoli sprouts". Massa 2012, Division of Mass Spectrometry - Società Chimica Italiana, Palermo, 1-5 luglio 2012.

Mazzarella N., Gallotta I., Baima S., Morelli G., Hilliard M.A., Ruberti I., Bazzicalupo P., Di Schiavi E. "Identification of neuroprotective molecules using a *C. elegans* model of spinal muscular atrophy". Berlin *C. elegans* Meeting 2014, Berlino, 15-17 maggio 2014.

Natella F., Baima S., Maldini M., Trost K., Nardini M., Azzini E., Foddai M.S., Giusti A.M., Mattivi F., Morelli G., Scaccini S. "Development of standardized food matrices by using food-metabolomics". 11th NuGO week, Castellammare di Stabia (NA), 8-11 settembre 2014.

Ranaldi, G., Ferruzza, S., Rossi, C., Sambuy, Y., Perozzi, G., Murgia, C. "Zn depleted intestinal cells susceptible to inflammatory challenges: protection by food bioactives." 11th NuGO week, Castellammare di Stabia (NA), 8-11 settembre 2014.



Sambuy Y., Ferruzza S., Giusti A., Maldini M., Mattivi F., Moneta E., Morelli G., Murgia C., Nardini M., Natella F., Ranaldi G., Rossi C., Scaccini C., Trost K., Baima S. "An inflamed human intestinal cell culture model to study the protective effects of plant-derived foods". Kirkstall Advances in Cell and Tissue Culture, Tirrenia (PI), 15-17 giugno 2015.

Roma, 11 agosto 2016



Il Coordinatore scientifico
Progetto NUTRIGEA
(Dr. Giorgio Morelli)

