



PROGRAMMA DI RICERCA STM 2011

Relazione Finale

Nanotossicità ed apoptosi nell'organismo modello *Hydra vulgaris*

Il Fruitore: Dott. **Alfredo Ambrosone**, PhD

Il Responsabile Scientifico: dott.ssa **Claudia Tortiglione**, PhD

Istituto di afferenza : Istituto di Cibernetica "E. Caianiello"

Istituzione ospitante: Ludwig-Maximilians University of Munich - Germany (Department Biologie II)

Dipartimento di afferenza (tendina) cod.7: Materiali e Dispositivi



Introduzione

L'impiego di nanoparticelle (NPs) nel settore biomedicale apre affascinanti scenari per la diagnosi e la terapia di malattie e tumori. Tra la vasta gamma di NPs con dimensioni inferiori a 100 nm, i Quantum Dots (QDs) trovano un crescente interesse in nanomedicina. I QDs sono nanocristalli colloidali caratterizzati dalla presenza di un nucleo centrale (core), generalmente costituito da semiconduttori (Cadmio telluro, CdTe; Cadmio Selenio, CdSe; Indio-Fosforo, InP), rivestito da uno strato protettivo (shell) di materiali inerti. Grazie alle eccellenti proprietà foto-fisiche, i QDs possono essere utilizzati come potenziali strumenti per *bioimaging* e *drug delivery*. Nonostante l'importanza di tali applicazioni, l'impiego dei QDs è limitato dal rischio tossicologico e necessita, quindi, di più approfondite indagini. La nanotossicologia, branca della tossicologia, si occupa dello studio dell'interazione tra nanomateriali di nuova sintesi e sistemi biologici, determinandone gli effetti deleteri su cellule e modelli animali. Infatti, le innumerevoli interazioni bio-non bio, la compartimentalizzazione intracellulare e le attività enzimatiche dei sistemi viventi, possono destabilizzare la struttura dei QDs provocando il rilascio di metalli pesanti nell'ambiente cellulare/extracellulare, inducendo la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e innescando processi di morte cellulare. A questo proposito, è stato dimostrato inoltre che nanoparticelle di diversa natura possono innescare meccanismi differenti di morte cellulare, inducendo necrosi o avviando processi di morte programmata (apoptosi). Mentre numerosi studi di nanotossicologia sono attualmente in corso su sistemi cellulari, pochi sono i modelli animali impiegati in queste tipologie di analisi. L'organismo di acqua dolce *Hydra vulgaris*, membro dell'antico Phylum degli Cnidaria, è estremamente suscettibile a contaminanti ambientali e per questo utilizzato largamente come biosensore in saggi di tossicità. Hydra presenta la morfologia di un polipo e consiste principalmente di due strati muscolo-epiteliali, uno interno (endoderma) ed uno esterno (ectoderma) separati da una matrice extracellulare (mesoglea). Negli ultimi anni, è stato dimostrato che Hydra rappresenta un valido sistema biologico per lo studio dell'interazione *in vivo* animale (bio)-Nanoparticelle (non-bio). Inoltre, il recente sequenziamento del genoma di Hydra ha mostrato un'alta conservazione dei principali pathway molecolari, proponendo tale organismo come modello alternativo per la ricerca in ambito molecolare e cellulare. Nel presente lavoro, effettuato in collaborazione con il gruppo di biologia guidato dalla dr. Angelika Bottger, presso l'Università Ludwig-Maximilians di Monaco è stata studiata l'interazione di QDs di diversa natura con *H. vulgaris* descrivendone a diversi livelli la potenziale nanotossicità.

Obiettivi

Il presente programma di ricerca si propone di studiare la tossicità indotta da **nanoparticelle colloidali a core semiconduttore (QD)** nell'organismo modello *Hydra vulgaris*. In particolare, il progetto ha come obiettivo principale la caratterizzazione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della risposta citotossica, focalizzando l'attenzione sui processi di morte cellulare programmata (apoptosi) e/o necrosi.

Attività svolte e Risultati ottenuti

Nanoparticelle di diversa natura possono indurre risposte cellulari, morfologiche e fisiologiche in organismi viventi. Al fine di valutare gli aspetti tossicologici di QDs con differenti core metallici (Cadmio-Tellurio e Indio-Fosforo) in *H. vulgaris*, sono stati eseguiti saggi di valutazione morfo-strutturale per la determinazione delle dosi letali e subletali. In particolare, gruppi di 25 animali sono stati incubati in presenza di concentrazioni crescenti di QDs (da 1 a 100 nM) e le alterazioni morfologiche dei polipi sono state monitorate fino a 72 ore mediante il metodo di Wilby ampiamente impiegato in hydra. In particolare La procedura di Wilby valuta i danni morfologici del polipo assegnando un punteggio decrescente da 10 (animale intatto) a 0 (animale disintegrato) (Fig. 1).

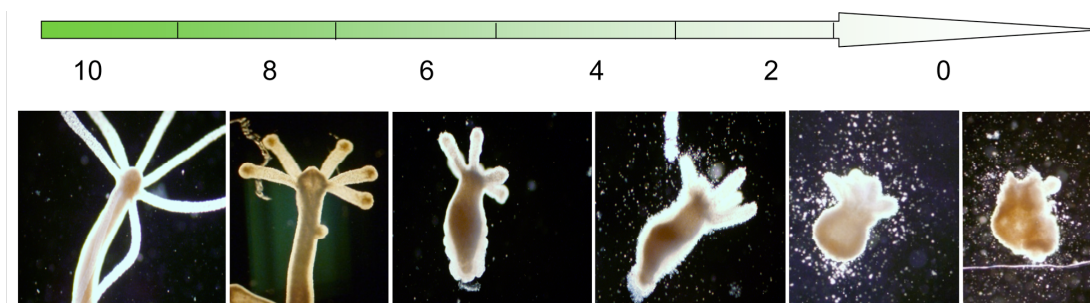


Figura 1. Il metodo Wilby valuta le alterazione morfo-strutturali del polipo. Ampiamente utilizzato negli studi di tossicologia, esso assegna il massimo punteggio (10) ad animali che non presentano segni di stress. Punteggi gradualmente decrescenti, invece, sono assegnati alla comparsa dei primi sintomi di sofferenza, quali contrazione dei tentacoli e del corpo, in risposta a stimoli esogeni. Gli animali completamente disintegrati assumono punteggio pari a 0.

I dati ottenuti hanno mostrato che le NPs di CdTe provocano seri danni (dose e tempo-dipendenti) alla struttura dell'animale, determinandone la contrazione del corpo e dei tentacoli fino alla morte. I dati di mortalità sono stati, quindi, utilizzati per determinare parametri di tossicità come l'LC50 (Lethal Concentration 50%) e l'LT50 (lethal Time 50%) mediante il metodo di Spearman-Kärber (Tab. 1).

LC50 (mg/L)		LT50 (hr)	
	QD (Cd eq)	QD 0.4 mg/L	80.15 (9.86)
24 h	1.4	QD 1 mg/L	60.59 (10.41)
48 h	1.3		
72 h	0.72		

Tabella 1. Tossicità acuta dei CdTe QDs in *H. vulgaris*. La concentrazione letale 50% (LC50) e il tempo letale 50 % (LT50) sono stati stimati applicando il metodo statistico Spearman-Kärber ai parametri tossicologici secondo la scala di valutazione di Wilby.

Al contrario, i QDs di Indio-Fosforo non hanno indotto alterazioni significative della struttura del polipo (dati non mostrati) per cui non è stato possibile determinare parametri di tossicità alle dosi impiegate.

I meccanismi alla base della morte cellulare determinata dal trattamento con nanoparticelle sono stati studiati a livello cellulare e molecolare in risposta a dosi subletali di CdTe QDs e InP QDs. In particolare, mediante saggi cellulari è stato possibile determinare inequivocabilmente l'attivazione dei processi apoptotici durante l'esposizione a QDs. Animali controllo (non trattati) ed animali trattati fino a 72 ore con QDs sono stati macerati al fine di ottenere una fine sospensione cellulare. Con lo scopo di determinare la frammentazione nucleare, evento caratteristico del processo apoptotico, le cellule sono state, quindi, fissate, depositate su vetrino e incubate con il colorante nucleare DAPI. La conta cellulare ha evidenziato chiaramente un aumento di cellule apoptotiche in seguito ad esposizioni prolungate di CdTe QDs (Fig.2, A). Il dato è stato successivamente confermato mediante saggio della *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end* (TUNEL) in grado di predire con maggiore accuratezza la frammentazione nucleare e la formazione di corpi apoptotici (Fig. 2, C). Anche in questo caso, hydre trattate con InP QDs non hanno presentato significative alterazioni della percentuale di cellule apoptotiche, suggerendo che tali particelle non hanno effetti citotossici alle concentrazioni indicate.

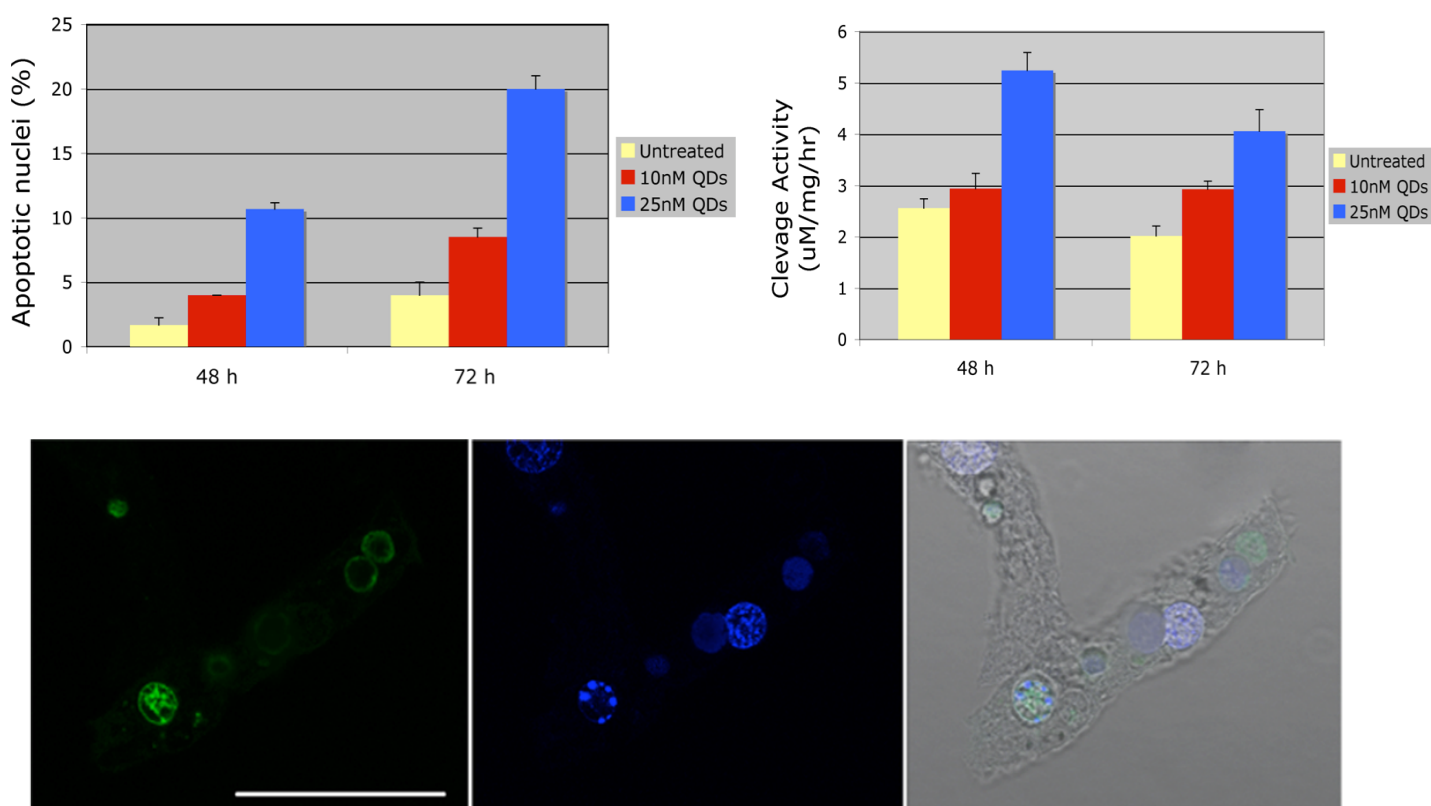


Figura 2. CdTe QDs inducono apoptosi in hydra. A) Percentuale di cellule apoptotiche in animali trattati con 10 e 25 nM CdTe QDs per 48 e 72 ore. B) Immagini rappresentative di una cellula epiteliale (sulla destra, campo chiaro) che ha fagocitato un corpo apoptotico riconoscibile dalla frammentazione dell'acido nucleico marcato con DAPI (foto al centro) e TUNEL (foto a destra) (unità di misura: 20 μ m). C) Misura dell'attività enzimatica della caspasi-3 mediante saggio fluorimetrico dell'Amminometilcumarina (AMC) rilasciata dopo il clivaggio del substrato specifico Ac-DEVD-AMC.



Tipicamente indotte durante l'apoptosi, le caspasi, appartenenti ad una vasta famiglia di proteasi, svolgono numerose attività proteolitiche ai danni di diverse strutture cellulari. Tra queste, grazie alla sua specificità di azione, la caspase-3 (casp-3) è ampiamente impiegata come marcatore apoptotico. Al fine di determinare i livelli di attivazione proteolitica, il substrato specifico della caspasi-3 (Ac-DEVD-AMC) è stato incubato con estratti nativi di hydre trattate con CdTe QDs. I dati riportati in Fig 2, C mostrano che, dopo 48 e 72 ore di incubazione, concentrazioni crescenti di nanoparticelle innalzano l'attività enzimatica della casp-3 indicando che l'esposizione a CdTe QDs attiva biochimicamente le vie apoptotiche.

In ultimo, al fine di valutare la risposta genetica ai QDs, RNA estratti da hydre trattate fino a 48 ore con 10 e 25 nM QDs sono stati utilizzati per analizzare l'espressione di geni chiave del pathway apoptotico (*myc*, *bcl2*, *caspase* e *foxO*). Lo studio di espressione effettuato mediante qRT-PCR ha mostrato che i profili di espressione dei geni selezionati erano significativamente alterati in risposta al trattamento con i QDs (Fig.3).

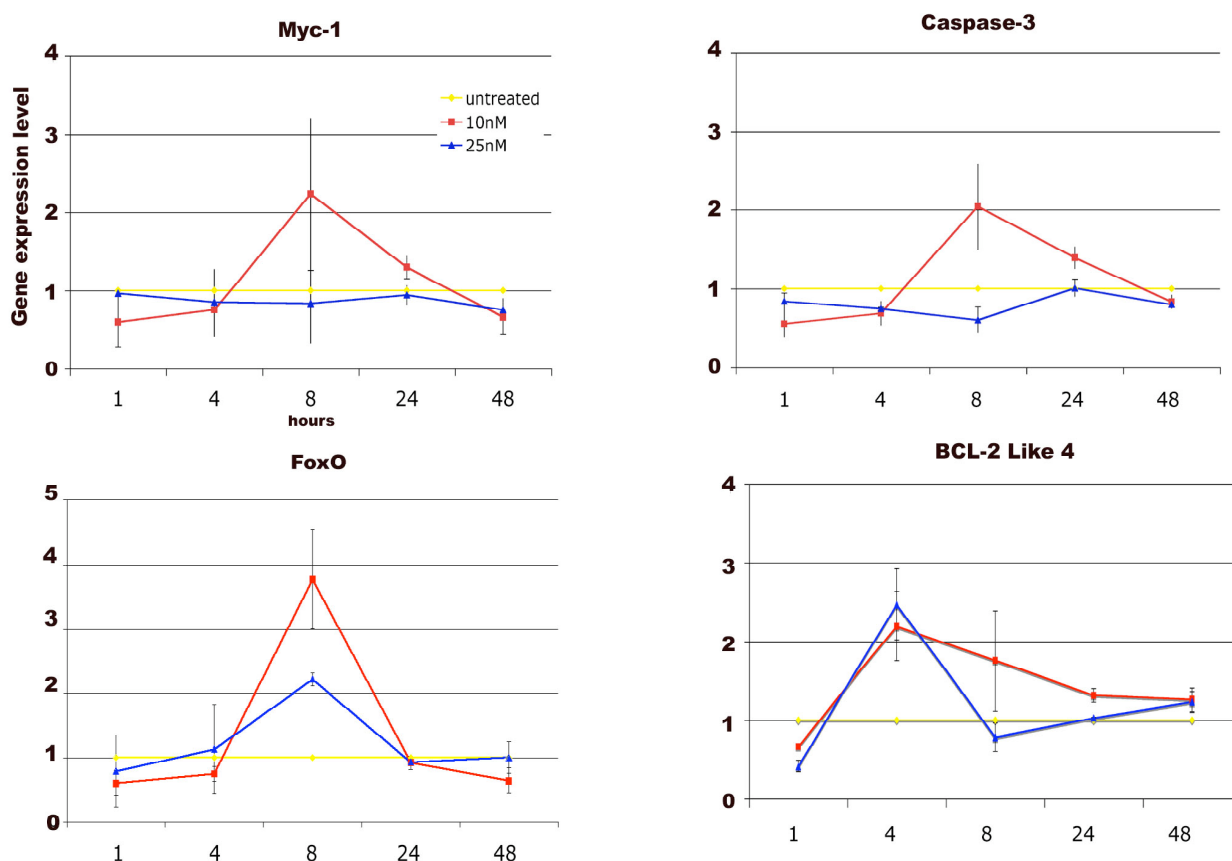


Figura 3. Studio di espressione genica mediante qRT-PCR in hydre trattate con Cdte QDs. Lo studio di espressione nei tempi indicati è stato normalizzato utilizzando il gene codificante-1 α (*ef- 1 α*). I dati rappresentano la media di valori ottenuti da tre campioni biologici analizzati ognuno in triplicato.



In particolare, i geni sono risultati sovraespressi dopo 8 ore di esposizione a QDs suggerendo che tali nanoparticelle inducono in breve tempo l'attivazione genetica e molecolare dei processi apoptotici.

In conclusione, nanoparticelle di diversa natura possono indurre risposte fisiologiche, cellulari e molecolari differenziate. Nella presente attività di ricerca sono stati comparati gli effetti di QDs con differenti *core* metallici (Cadmio-Tellurio e Indio-Fosforo) in *H. vulgaris*. In particolare, è stato dimostrato che, mentre Quantum Dots con nucleo di Indio-fosforo non hanno mostrato effetti letali e sub-letali a livello animale e cellulare, QDs con *core* costituito da cadmio-tellurio inducono significative alterazioni morfo-strutturali, biochimiche e genetiche compromettendo gravemente l'omeostasi cellulare ed inducendo meccanismi di morte programmata in Hydra.

Firma del Fruitore

.....