



PROGRAMMA DI RICERCA STM 2013

Relazione Finale

Rilascio controllato di biomolecole in un organismo modello

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

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

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

Istituzione ospitante: Department of Physics, Philipps Universitaet Marburg, GERMANY

Dipartimento di afferenza: Scienze fisiche e tecnologie della materia



Introduzione

Gli attuali progressi nel campo dei biomateriali hanno notevolmente incoraggiato lo sviluppo di nanodispositivi per applicazioni biologiche e biomediche. Uno degli aspetti più affascinanti e di maggiore interesse in questo settore riguarda il rilascio controllato di biomolecole per fini terapeutici. E' ormai risaputo, infatti, che trattamenti farmacologici invasivi e di lunga durata spesso producono effetti citotossici sistemici difficilmente controllabili. Recentemente, grazie all'impiego di nanomateriali con proprietà ottiche, sono state ottenute microcapsule polimeriche in grado di rilasciare il proprio contenuto dopo stimolazione con irradiazione NIR (*Near Infrared*). Promettenti risultati sono stati raggiunti utilizzando modelli biologici *in vitro*, suscitando, quindi, grande interesse per il trasferimento di tale tecnologia in organismi più complessi. Negli ultimi anni, l'organismo di acqua dolce *Hydra vulgaris*, membro dell'antico Phylum degli Cnidaria, è stato impiegato come valido sistema biologico per lo studio dell'interazione *in vivo* animale (bio) - Nanoparticelle (non-bio). *Hydra* presenta la morfologia di un polipo costituito principalmente da due strati muscolo-epiteliali, uno interno (endoderma) ed uno esterno (ectoderma) separati da una matrice extracellulare (mesoglea). 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 programma di mobilità, svolto in collaborazione con il gruppo di fisica guidato dal Prof. Wolfgang J. Parak, presso Philipps-Universität di Marburg (Germania), microcapsule polimeriche sono state sintetizzate e caratterizzate al fine di studiare *in vivo* il rilascio di biomolecole nell'organismo modello *H. vulgaris*.

Obiettivi

Il presente programma di ricerca si propone di testare e validare un innovativo sistema di trasporto e rilascio di biomolecole nell'organismo modello *H. vulgaris*. In particolare, il progetto ha come obiettivo principale lo sviluppo di vettori intelligenti per *in vivo drug delivery* basati su microcapsule polimeriche in grado di rilasciare il proprio contenuto dopo irradiazione con luce del vicino infrarosso (NIR).

Attività svolte e Risultati ottenuti

Sintesi di microcapsule polimeriche

Microcapsule (MCPs) di diversa natura sono state sintetizzate mediante assemblaggio *layer-by-layer* di polielettroliti. Nelle attività di ricerche connesse al presente programma, MCPs costituite da polimeri degradabili (poli-arginina e destrano) e non-degradabili (PSS, *polystyrene sulfonate*; PAH, *poly-allylamine hydrochloride*) sono state ottenute presso il lab del prof. W.J. Parak. In particolare, microcristalli di carbonato di calcio (CaCO_3) sono stati impiegati come nuclei sacrificali per la sintesi di strati polimerici esterni. Al termine della deposizione *layer-by-layer*, i nuclei sono stati solubilizzati impiegando agenti intercalanti. Inoltre, aggregati di oro di diverse dimensioni sono stati adsorbiti tra gli strati polimerici delle MCPs non degradabili, al fine di conferire loro proprietà ottiche. Più in dettaglio, l'irraggiamento con sorgente laser NIR produce il surriscaldamento degli aggregati d'oro favorendo la disorganizzazione degli strati polimerici e, quindi, il rilascio del contenuto delle MCPs.



Le capsule sono state, infine, caricate con fluorofluori di diversa natura (SNARF, Nile red, FITC) mediante processi di *pre-loading* (co-precipitazione di micelle idrofobiche nei nuclei di CaCO_3) o *post-loading* (mediante trattamenti termici). La struttura, le dimensioni e la fluorescenza delle microcapsule così ottenute sono state caratterizzate mediante l'impiego di microscopia a fluorescenza.

- Biocompatibilità, internalizzazione e biodistribuzione di MCPs

Biomateriali di diversa natura possono indurre risposte cellulari, morfologiche e fisiologiche in organismi viventi. Al fine di valutare gli aspetti tossicologici delle MCPs, biodegradabili e non, sono stati eseguiti saggi di valutazione morfologica in *H. vulgaris*. Le MCPs sono state incubate per diversi tempi (da 4 a 24 ore) e a diluizioni seriali in presenza di polipi. Nessun segno di nanotossicità è stato osservato negli animali trattati con concentrazioni di MCPs molto elevate (10^8 MCPs/ml).

È stata, quindi, studiata la dinamica di *uptake* di MCPs attraverso microscopia a fluorescenza. Più in dettaglio è stato osservato che le MCPs, biodegradabili e non, sono efficientemente internalizzate nell'arco delle 24 ore. Inoltre, al fine di monitorare la localizzazione delle MCPs, sono state eseguite analisi di microscopia confocale. Polipi transgenici, che esprimono la proteina fluorescente GFP nello strato ectodermico sono stati incubati con microcapsule fluorescenti e osservati mediante analisi *z-stack*. Tale approccio sperimentale ha permesso di caratterizzare la biodistribuzione delle capsule, dimostrando che esse si accumulano prevalentemente nell'ectoderma di *H. vulgaris* (fig. 1).

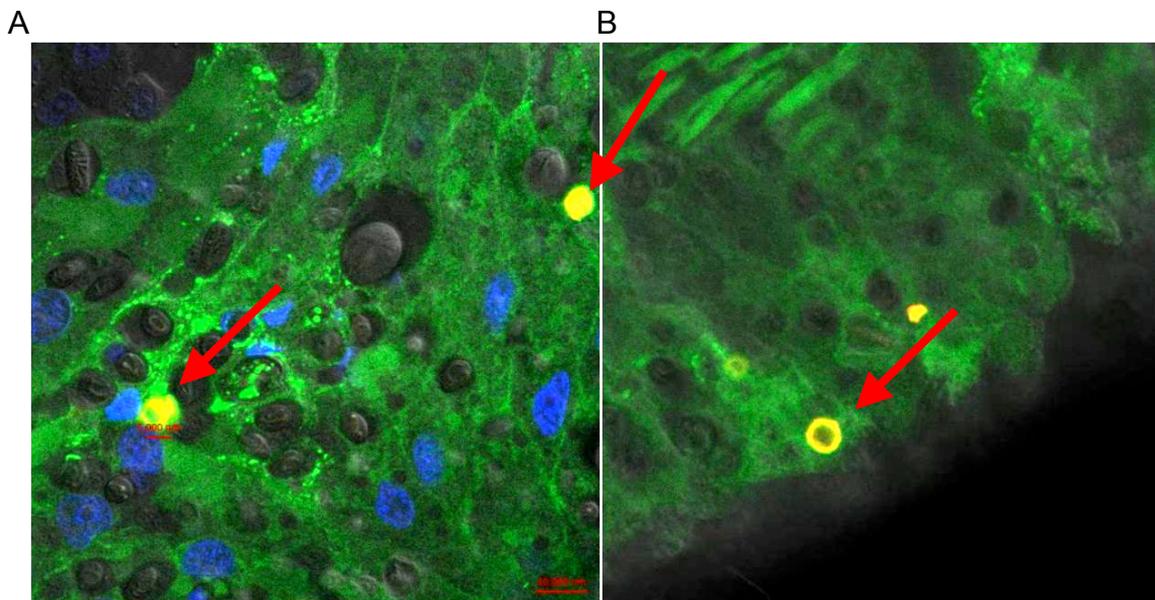


Figura 1. Internalizzazione e localizzazione di MCPs in *H. vulgaris*. Animali transgenici, esprimenti la GFP nell'ectoderma, sono stati incubati per 24 ore con MCPs a diverse concentrazioni. Le capsule, indicate con frecce rosse (A e B), contenevano un tracciante con emissione nella lunghezza d'onda del rosso (Nile red) nella loro cavità ed un fluoroforo con emissione nella lunghezza d'onda del verde (FITC) nella struttura polimerica esterna. Le immagini sono state acquisite mediante microscopia confocale. Le MCPs localizzavano prevalentemente nell'ectoderma.



Rilascio di biomolecole da MCPs biodegradabili

Polipi di *H. vulgaris*, incubati con MCPs biodegradabili, a diversi tempi e a diverse concentrazioni, sono stati analizzati mediante microscopia a fluorescenza. Dopo 24 ore di incubazione con MCPs biodegradabili, gli animali mostravano un'alta efficienza di internalizzazione di MCPs (Fig 2, B). Inoltre, i polipi presentavano una diffusa marcatura fluorescente lungo il corpo, segno di un massivo rilascio di fluoroforo (Fig 2, D). Questi dati suggeriscono che le MCPs biodegradabili rilasciano velocemente il loro contenuto e rappresentano un sistema sicuro ed efficiente per la consegna di biomolecole *in vivo*.

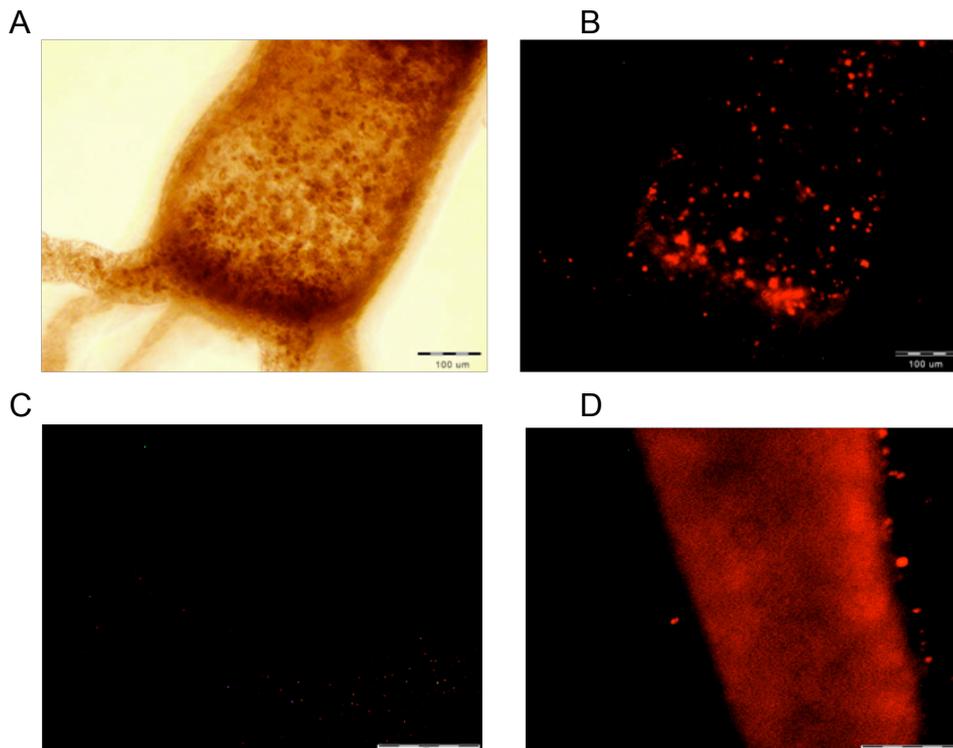


Figura 2. Internalizzazione di MCPs biodegradabili in *H. vulgaris*. A) polipo di *H.vulgaris* trattato con MCPs in campo chiaro B) Internalizzazione di MCPs contenenti Nile red. C) Background in fluorescenza di un polipo trattato con MCPs. D) Fluorescenza diffusa determinata dal rilascio del fluoroforo Nile red in un polipo trattato con MCPs biodegradabili.

Internalizzazione di capsule non-biodegradabili e rilascio di fluorofori mediante laser NIR

MCPs non-biodegradabili sono state incubate, a diversi tempi e a diverse concentrazioni, nella coltura di *H. vulgaris* per 24 ore. La presenza di MCPs lungo il corpo degli animali e l'assenza di *background* fluorescente dimostrano che le capsule penetrano nel corpo dell'animale, ma non rilasciano spontaneamente il loro contenuto (fig. 3). Tali capsule quindi sono state impiegate per lo studio del rilascio controllato mediante irraggiamento NIR localizzato.

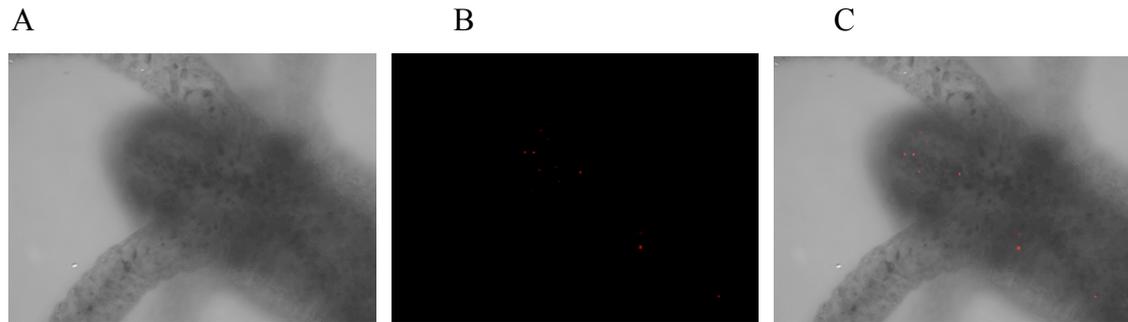


Figura 3. Internalizzazione di MCPs non-biodegradabili. A) polipo di *H. vulgaris* trattato con MCPs non-biodegradabili in campo chiaro B) Acquisizione in fluorescenza del polipo in A. C) Sovrapposizione delle immagini A e B. Le MCPs si distribuiscono uniformemente lungo il corpo delle idre trattate. L'assenza di un *background* fluorescente diffuso conferma la capacità di queste MCPs nel contenere in maniera stabile il fluoroforo incorporato nella cavità.

In particolare gli animali trattati con MCPs non-biodegradabili, sono stati lavati abbondantemente, e depositati su un vetrino da microscopio in una piccola quantità di soluzione anestetizzante per ridurre al minimo la contrazione degli animali stessi. Il trattamento laser è stato eseguito al microscopio ottico. Più in dettaglio, la sorgente laser è stata accoppiata ad un obiettivo con ingrandimento 63X, impiegato per la messa a fuoco e l'irraggiamento degli animali trattati con MCPs. Nelle condizioni sperimentali descritte, tale obiettivo ha permesso di focalizzare il laser NIR su una superficie sferica con diametro di circa 36 μm , consentendo quindi l'irraggiamento duna singola capsula per cellula (fig 4).

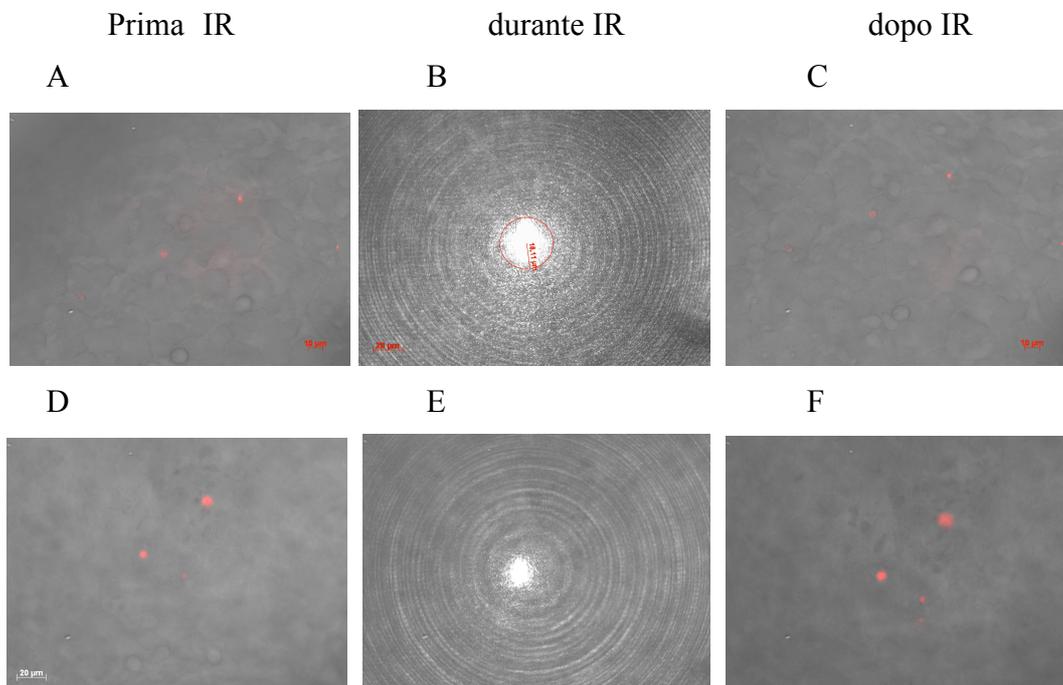


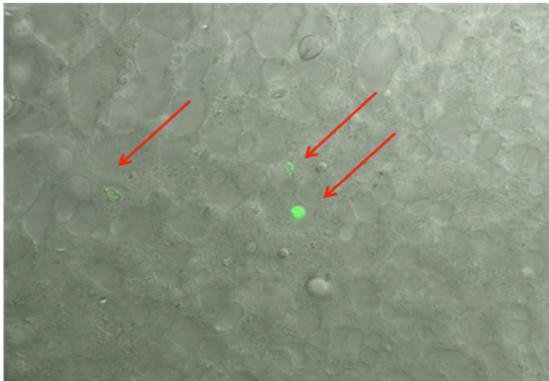
Figura 4. Irraggiamento con laser NIR. Polipi trattati con MCPs non-degradabili sono stati alloggiati su vetrini da microscopio e osservati con obiettivo 63X, al quale è stata accoppiata la sorgente laser NIR. A) e D) MCPs fluorescenti internalizzate nell'ectoderma di *H. vulgaris* prima dell'irraggiamento NIR. B) e E) Immagini catturate durante l'irraggiamento con laser NIR. C) e F) MCPs dopo trattamento laser.

Le caspule internalizzate nello strato ectodermico dell'animale sono state irradiate singolarmente per brevi intervalli (3-5 secondi) e poi osservate mediante microscopia a fluorescenza. Le osservazioni hanno permesso di identificare la presenza di deformazioni



dell'involucro delle MCPs dopo irraggiamento NIR. La destabilizzazione della struttura capsulare genera inoltre il rilascio del contenuto fluorescente come riportato in fig. 5, B.

A



B

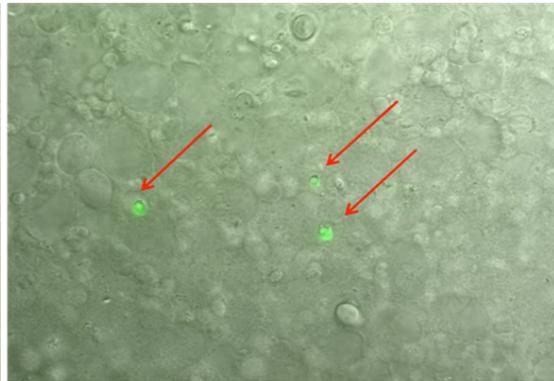


Figura 5. Rilascio controllato mediante laser NIR. A) MCPs non-biodegradabili contenenti il fluoroforo SNARF prima del trattamento laser. B) MCPs pochi secondi dopo irraggiamento laser. In B, la struttura delle capsule appare deformata ed è possibile osservare la fuoriuscita del tracciante fluorescente.

Conclusioni

Le microcapsule polimeriche impiegate nel presente lavoro rappresentano un valido strumento per la consegna e rilascio di biomolecole *in vivo*. L'impiego di alte concentrazioni di MCPs non ha prodotto effetti tossici sull'animale, confermando la loro biocompatibilità in organismi estremamente sensibili a sollecitazioni ambientali. Nel presente programma, inoltre, è stato osservato che le MCPs biodegradabili, costituite da strati di poli-arginina e destrano, rilasciano velocemente e ad alta efficienza il proprio contenuto, suggerendo il loro impiego per il rilascio sistemico di biomolecole. Infine, le MCPs non-degradabili, sensibili all'irraggiamento NIR, hanno mostrato una buona capacità di limitare il rilascio incontrollato di fluorofori. Nello stesso tempo, è stato dimostrato che l'irraggiamento NIR provocava deformazioni della struttura polimerica consentendo, quindi, di controllare temporalmente e spazialmente il rilascio del contenuto della microcapsula. Il presente studio, incentrato principalmente sull'impiego di molecole traccianti, getta le basi per lo sviluppo *in vivo* di sistemi intelligenti per la consegna mirata di biomolecole ad interesse terapeutico.

Firma del Fruitore