



SITOX

20° Congresso Nazionale

Società Italiana di Tossicologia

**Sostanze
di origine naturale:
farmaci, veleni o entrambi**

BOLOGNA 25-26-27 Ottobre 2021

www.sitox.org

Un nuovo approccio sullo studio della palitossina utilizzando cellule staminali

Dr. Marco Pelin

Università di Trieste – Dipartimento di Scienze della Vita

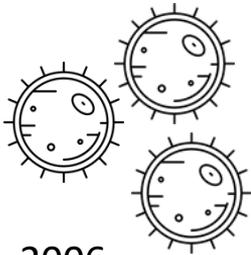


UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TRIESTE

Dipartimento di
Scienze della Vita

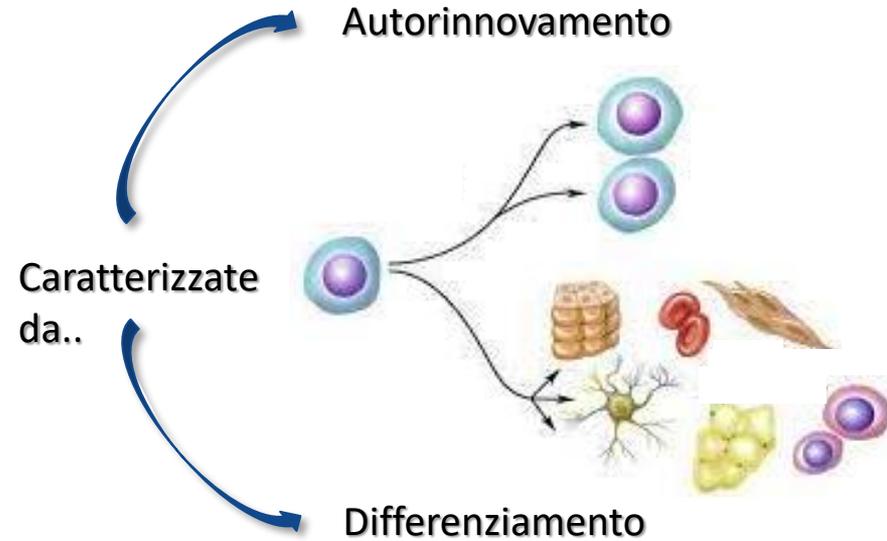
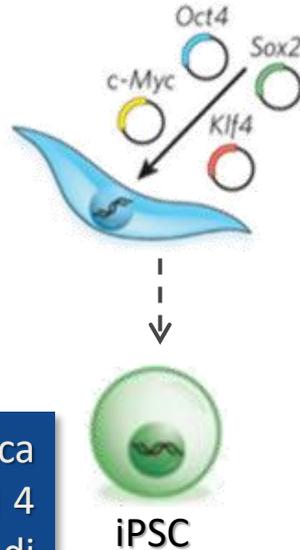


Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)

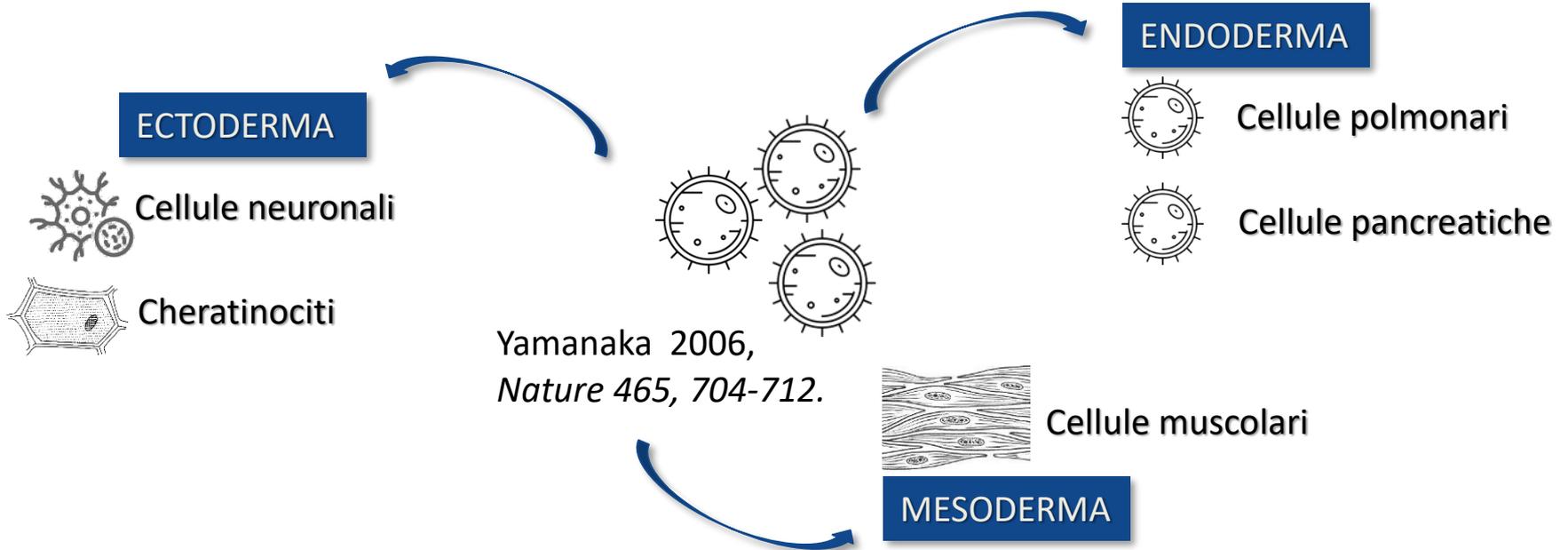


Yamanaka 2006,
Nature 465, 704-712.

Derivate da una cellula somatica adulta mediante l'inserzione di 4 geni codificanti per fattori di trascrizione



Cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)



iPSC: potenziali usi

MEDICINA RIGENERATIVA

- Ingegneria tissutale
- Rigenerazione *ex-vivo*
- Trapianti autologhi

CELL THERAPY

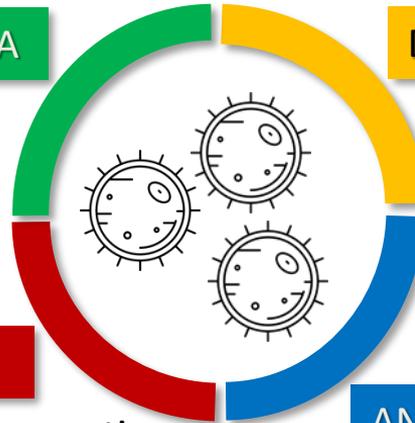
- Patologie degenerative
- Correzioni genetiche
- Trapianti autologhi

DISEASE MODELLING

- Caratterizzazione genetica di patologie complesse
- *Screening* di nuovi farmaci
- Terapia personalizzata

ANALISI TOSSICOLOGICHE

- Studi di embriotossicità
- Studi tossicogenomici



Palitossina: vie di esposizione



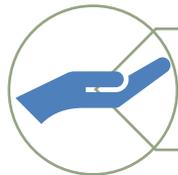
ORALE

→ Ingestione di prodotti ittici contaminati con PLTX



INALATORIA

→ Aerosol marino durante proliferazioni di *Ostreopsis*
→ Vapori durante la pulizia di acquari domestici contenenti coralli del genere *Palythoa*



CUTANEA

→ Contatto diretto con coralli del genere *Palythoa*
→ Contatto con acqua marina durante proliferazioni di *Ostreopsis*



OCULARE

→ Aerosol marino durante proliferazioni di *Ostreopsis*
→ Schizzi di acqua durante la pulizia di acquari contenenti coralli del genere *Palythoa*

Palitossina: potenziale embriotossicità

Chemosphere 73 (2008) 267–271

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



- Test di teratogenesi su *Xenopus laevis*:
 - Mortalità dell'embrione (80% a 370 nM)
 - Malformazioni e ritardi nello sviluppo
 - Alterazioni strutturali

Chemosphere 77 (2009) 308–312

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



Expression of the genes *siamois*, *engrailed-2*, *bmp4* and *myf5* during *Xenopus* development in presence of the marine toxins okadaic acid and palytoxin

Antonella Franchini, Livio Casarini, Davide Malagoli, Enzo Ottaviani *

Department of Animal Biology, University of Modena and Reggio Emilia, via Campi 213/D, 41100 Modena, Italy

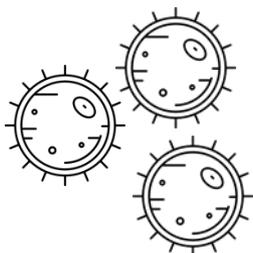
Toxicological effects of marine palytoxin evaluated by FETAX assay

Antonella Franchini, Livio Casarini, Enzo Ottaviani *

Department of Animal Biology, University of Modena and Reggio Emilia, via Campi 213/D, 41100 Modena, Italy

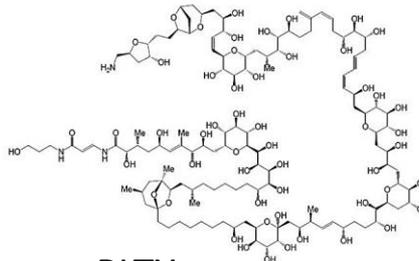
- **PLTX**: interferisce con l'espressione genica durante lo sviluppo dell'embrione: *up-regulation* di geni correlati allo sviluppo neurale e muscolare

Disegno sperimentale



Linea di cellule iPSC 253G1

(*Proff. Katsunori Sasaki e Fengming Yue;
Shinsu University, Matsumoto, Giappone*)



PLTX

(*Wako; purezza >95%*)

POTENZIALE
EMBRIOTOSSICO

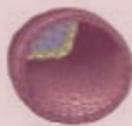
POTENZIALE IN MEDICINA
RIGENERATIVA

(I) Effetti della PLTX su cellule iPSC indifferenziate:

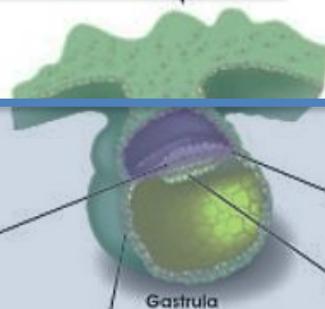
- Citotossicità (saggio MTT)
- Pluripotenza e/o differenziazione (qPCR)



Zygote



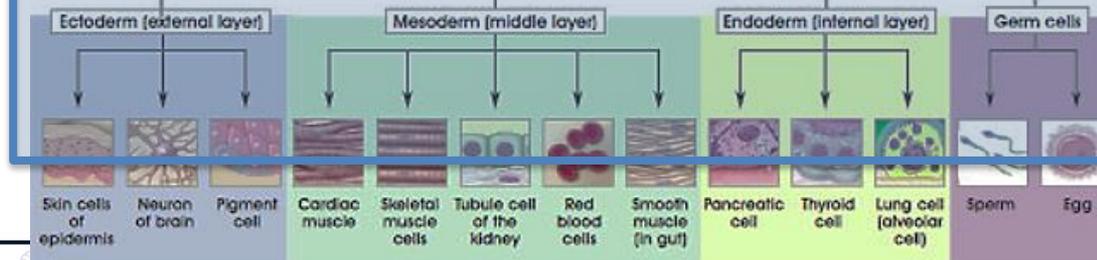
Blastocyst



Gastrula

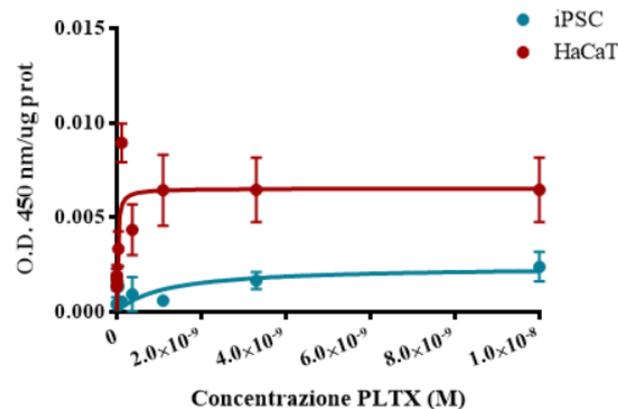
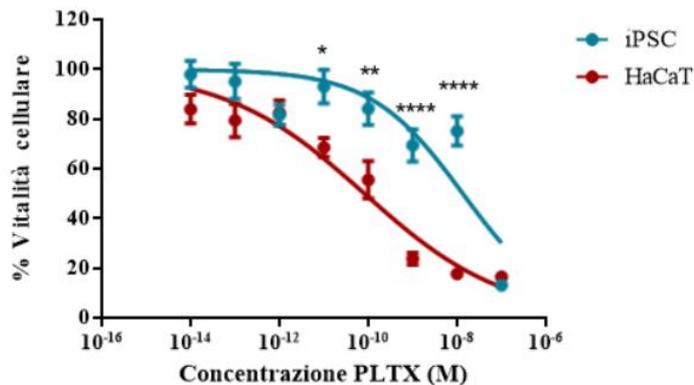
(II) Effetti della PLTX durante il differenziamento delle cellule iPSC:

- Differenziazione (qPCR)



Risultati (I)

Le cellule iPSC sono maggiormente resistenti agli effetti della PLTX (4 ore) rispetto a cellule somatiche



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$
(ANOVA a due vie e post-test di Bonferroni)

PLTX	EC50 (M)	Lower (M)	Upper (M)	p-value
iPSC 253G1 4h	1,30E-08	4,859E-09	3,766E-08	
HaCaT 4 h	8,3E-11	3,547E-11	1,938E-10	1,7E-07 ****

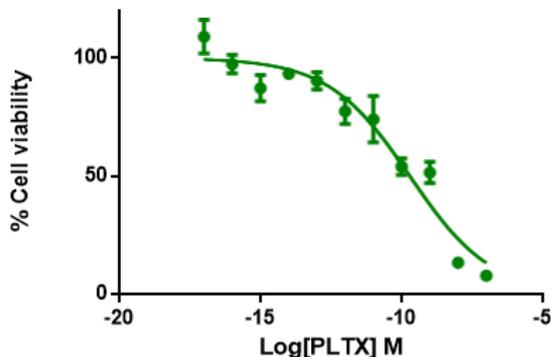
PLTX	Kd (M)	Lower	Upper	p-value
iPSC 253G1 4h	1,114E-09	-3,25E-10	2,553E-09	
HaCaT 4 h	1,907E-11	7,71E-12	3,043E-11	2,735E-08 ****

PLTX	Bmax (M)	Lower	Upper	p-value
iPSC 253G1 4h	0,002405	0,0014784	0,0033316	
HaCaT 4 h	0,006543	0,0058805	0,0072055	8,322E-06 ****

Risultati (I)

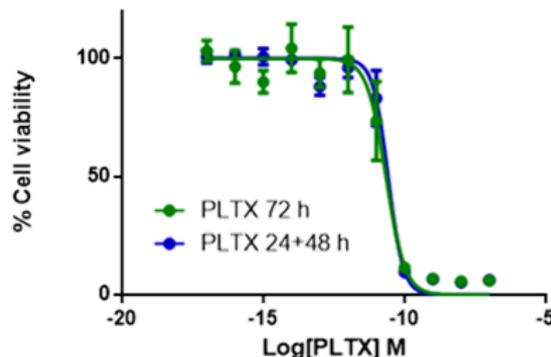
Gli effetti della PLTX sulle cellule iPSC sono irreversibili

PLTX 24 h



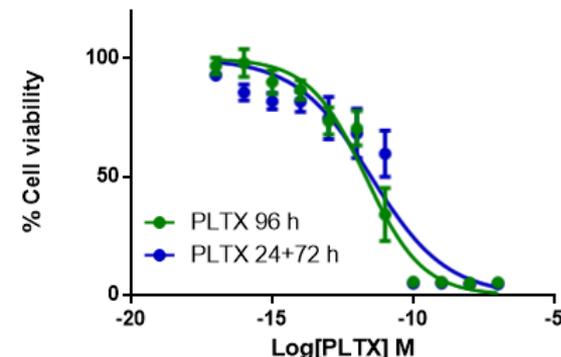
$$EC_{50} = 2.0 \times 10^{-10} \text{ M}$$

PLTX 72 h



$$EC_{50} \text{ PLTX 72 h} = 2.2 \times 10^{-11} \text{ M}$$
$$EC_{50} \text{ PLTX 24+48 h} = 2.6 \times 10^{-11} \text{ M}$$

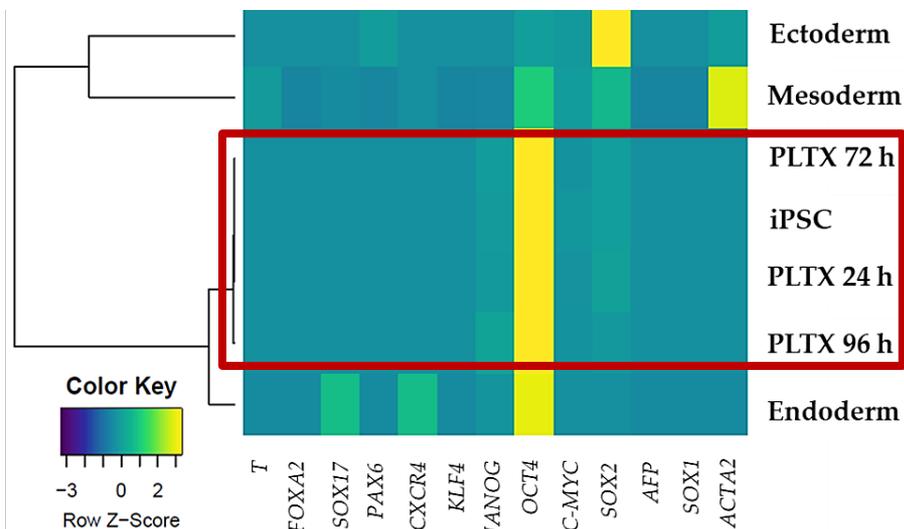
PLTX 96 h



$$EC_{50} \text{ PLTX 96 h} = 2.1 \times 10^{-12} \text{ M}$$
$$EC_{50} \text{ PLTX 24+72 h} = 3.2 \times 10^{-12} \text{ M}$$

Risultati (I)

PLTX (1x10⁻¹¹ M): sembra mantenere lo stato di pluripotenza nelle cellule iPSC



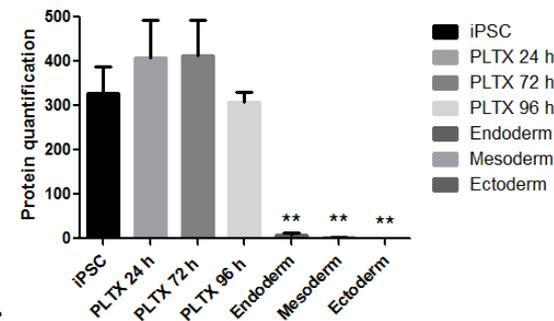
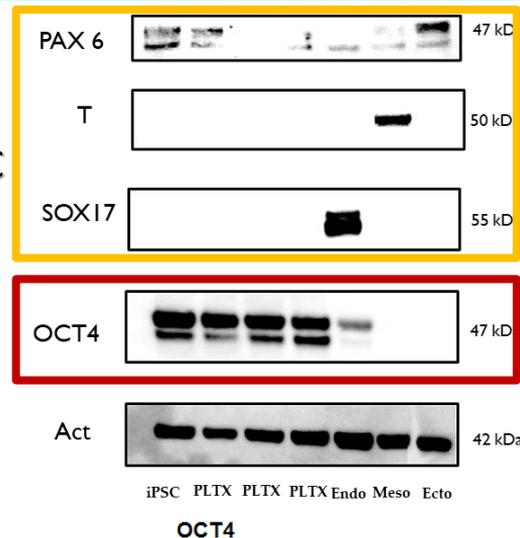
ANALISI DI CLUSTERING SU DATI DI ESPRESSIONE GENICA (2^{-ΔCt})

Marker ectoderma: PAX6, SOX1

Marker mesoderma: CXCR4, ACTA2, T

Marker endoderma: SOX17, FOXA2, AFP

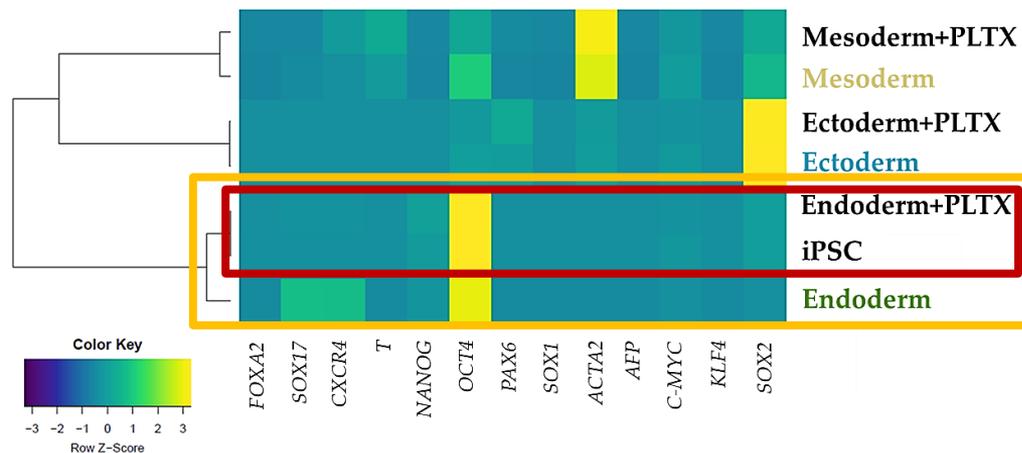
Marker pluripotenza: SOX2, c-MYC, KLF4, OCT4, NANOG



p<0.01; **p<0.0001 (ANOVA a una via e post-test di Bonferroni)

Risultati (II)

EFFETTI DELLA PLTX SUL DIFFERENZIAMENTO DELLE iPSC:
PLTX (1×10^{-11} M): sembra compromettere il differenziamento delle cellule iPSC verso le cellule endodermiche



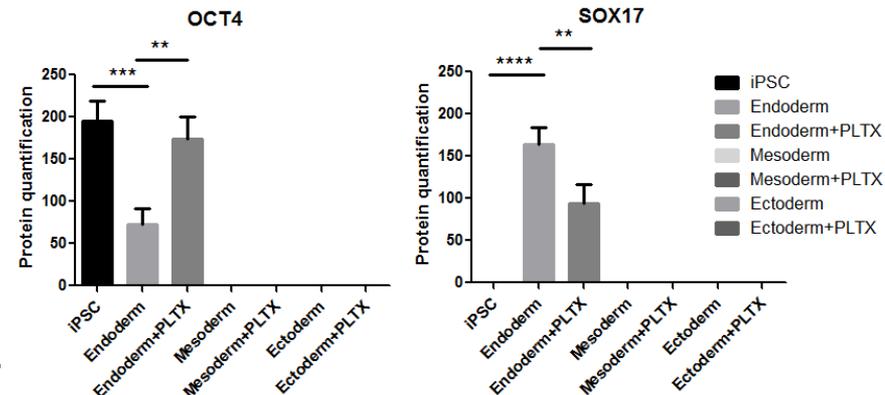
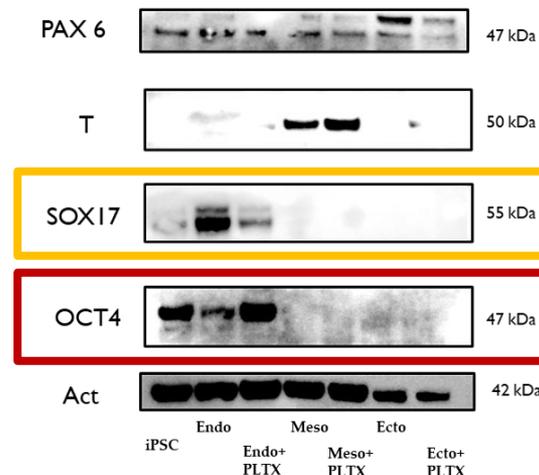
ANALISI DI CLUSTERING SU DATI DI ESPRESSIONE GENICA ($2^{-\Delta Ct}$)

Marker ectoderma: PAX6, SOX1

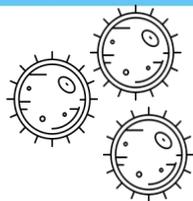
Marker mesoderma: CXCR4, ACTA2, T

Marker endoderma: SOX17, FOXA2, AFP

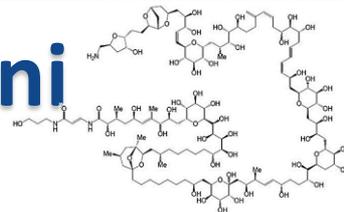
Marker pluripotenza: SOX2, c-MYC, KLF4, OCT4, NANOG



** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA a una via e post-test di Bonferroni)



Conclusioni



- Le cellule iPSC sono state utilizzate per studiare gli effetti della PLTX come modello di cellule pluripotenti
- Le cellule iPSC sono risultate più **resistenti** agli effetti della PLTX rispetto ad una linea cellulare somatica, benché gli effetti siano risultati significativi ed **irreversibili**
- La PLTX non sembra alterare la pluripotenza delle cellule iPSC, benché sia in grado di **compromettere il loro corretto differenziamento verso l'endoderma**
- Questo risultato suggerisce un potenziale impatto negativo della PLTX sulle **fasi precoci dell'embriogenesi** ma sono necessari ulteriori studi per verificare il potenziale embriotossico di questa tossina



GRUPPO DI
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA
DELLE SOSTANZE NATURALI



Prof. Aurelia Tubaro



Prof. Silvio Sosa



Dr. Cristina Ponti



Dr. Federica Cavion



Dr. Chiara Florio



Dr. Marco Pelin



Dr. Michela Carlin

**GRAZIE
PER L'ATTENZIONE..**