



# Applicazione della tossicogenomica in ecotossicologia

Roma, 13 Dicembre 2010

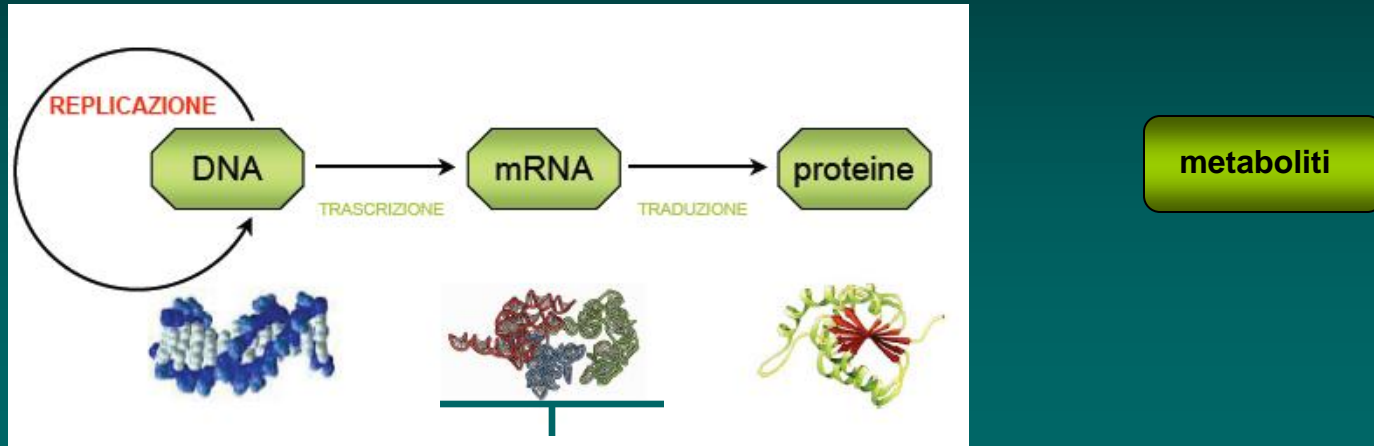
# La tossicogenomica

- ◆ Il sequenziamento del genoma umano e di molti altri organismi, associato allo sviluppo di strumenti per l'analisi globale del genoma, hanno rivoluzionato la biologia.
- ◆ Queste nuove tecnologie definite "OMICHE" integrano competenze di biologia, informatica ed ingegneria.
- ◆ La **tossicogenomica** consiste nella applicazione delle tecnologie genomiche alla tossicologia per studiare gli effetti avversi dei composti chimici



- Monitorare l'esposizione
- Valutare la pericolosità e il meccanismo d'azione
- Classificare le sostanze tossiche
- Definire la risposta a dosi differenti
- Contribuire all'estrapolazione da specie a specie
- Predire la variabilità individuale

# Le tecnologie tossicogenomiche



## Trascrittomica

La branca più avanzata della tossicogenomica

- Vasta applicazione in oncologia
- Definizione dei profili e MOA dei composti chimici
  - A supporto dell'indagine istopatologica

# Regolamento REACH

Recital 40. La Commissione, gli Stati membri, l'industria e gli altri soggetti interessati dovrebbero continuare a contribuire alla promozione, a livello internazionale e nazionale, di metodi di prova alternativi, tra cui metodologie assistite da computer, appropriate metodologie in vitro, **metodologie basate sulla tossicogenomica** e altre metodologie pertinenti. La strategia comunitaria di promozione di metodi di prova alternativi è una priorità e la Commissione dovrebbe garantire che essa rimanga tale nell'ambito dei suoi futuri programmi quadro di ricerca e di iniziative quali il piano d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali 2006-2010. Si dovrebbe puntare alla partecipazione degli operatori e ad iniziative che coinvolgano tutte le parti interessate.

# La tossicologia prepara la sua “rivoluzione”

- ◆ Il 15 febbraio 2008 in occasione del congresso annuale dell'**Associazione americana per l'avanzamento scientifico** (AAAS) tenutosi a Boston si è definito di un accordo per la creazione di un grande progetto di tossicogenomica a cui partecipano EPA ed NIH .
- ◆ “La tossicologia che noi pratichiamo da molti decenni si basa sugli **animali**”, spiega Francis Collins, direttore dell'Istituto nazionale di ricerca sul genoma umano (NHGRI). “Si prendono delle specie animali e si somministra loro il composto chimico che si desidera analizzare. Successivamente si vede se l'animale si ammala e, se ciò avviene, lo si esamina per verificare quali organi sono stati danneggiati”.
- ◆ “La **tossicologia cellulare**, al contrario, consiste nell'osservare in vitro, il modo in cui la cellula reagisce a una determinata molecola. Non occorrono cavie animali, dunque, ma **linee cellulari**.”
- ◆ Sulle colture cellulari trattate con i composti in esame si possono poi analizzare le alterazioni del materiale genetico attraverso **tecnologie genomiche**, per verificare se si ritrovano i geni modulati nei campioni provenienti da studi di tossicologia classica.

# Passaggio in vivo → in vitro

- ◆ La tossicogenomica consente di rifinire e ridurre gli esperimenti sull'animale grazie all'individuazione in vivo di biomarcatori, rilevanti ai fini del meccanismo di azione tossica, da trasferire poi in modelli in vitro basati su colture cellulari

## Es. Ro-Cmp-A: Hoffman-LaRoche

1. The use of gene expression profiles induced at **subchronic doses** administered over **7 days** made it possible to identify as a steatotic hepatotoxicant.
2. Remarkably, gene expression profiles induced by **acutely toxic** doses also identified Ro-Cmp-A as a steatotic hepatotoxicant as early as **24 hours** after exposure, despite a **lack of characteristic histopathology**.
3. In addition to the in vivo studies, exposure of rat hepatocytes to Ro-Cmp-A **in vitro** at **doses that also did not induce significant toxicity** induced a subset of the predictive genes.

# Da dove parte il progetto?

- ◆ ISPRA ha già proposto un progetto volto all'inserimento della specie autoctona *Dicentrarcus labrax* tra quelle riportate nel Regolamento 440/2008 per l'esecuzione dei saggi ecotossicologici su pesci.
- ◆ Oltre a questo, visto l'interesse espresso dalle strategie comunitarie verso lo sviluppo di test alternativi allo studio sull'animale, ISPRA ha individuato un secondo ambito progettuale in cui è previsto l'impiego di una linea stabilizzata di gonadi di *Oncorhynchus mykiss* per l'analisi della citotossicità basale delle sostanze chimiche.

# Obiettivo

- ◆ L'applicazione della trascrittomica all'ecotossicologia, con particolare riferimento ai pesci, in modo da rifinire e ridurre gli esperimenti **sull'animale grazie all'individuazione** in vivo di biomarcatori, rilevanti ai fini del meccanismo di azione tossica, da trasferire poi in modelli in vitro basati su colture cellulari.



# In vivo

- ◆ Specie di riferimento *Oncorhynchus mykiss* e *Dicentrarchus labrax*
- ◆ Esecuzione dei test di "tossicità acuta per i pesci" e di "crescita dei pesci giovani" (C1 e C14 del regolamento 440/2008, rispettivamente) esposti ai composti tossici di riferimento (da definire)



# Determinazioni in vivo

- ◆ **LC50**: concentrazione letale media , che è la concentrazione di una sostanza nell'acqua capace di uccidere il 50 % di un gruppo di pesci entro un periodo continuo di esposizione, la cui durata deve essere precisata.
- ◆ **LOEC** Minima concentrazione con effetto (Lowest Observed Effect Concentration): è la più bassa concentrazione testata di una sostanza in esame alla quale si osserva un effetto significativo ( $p < 0,05$ ) rispetto alla sostanza di controllo.
- ◆ **NOEC** Massima concentrazione senza effetto (No Observed Effect Concentration,): concentrazione di prova immediatamente inferiore alla LOEC.

# In vitro

## ◆ American Type Culture Collection

Description	Designation	
Oncorhynchus mykiss (trout, rainbow)	RTG-2	<b>Organ: mixed; testis; ovary</b>
Oncorhynchus mykiss (trout, rainbow)	RTH-149	<b>Organ: liver Disease: hepatoma</b>
Oncorhynchus mykiss (trout, rainbow)	SOB-15	<b>Organ: liver</b>
Oncorhynchus mykiss (trout, rainbow)	RTgill-W1	<b>Organ: gill</b>



**RTL-W1, has been developed from the normal liver of an adult rainbow trout by proteolytic dissociation of liver fragments.**

**◆ Differential cell sensitivity to cadmium exposure in RTgill-W1, RTG-2, and RTL-W1 rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) cell lines: an in vitro cell line model to study cadmium-induced cytotoxicity.**

Journal of the Idaho Academy of Science , June 1, 2008

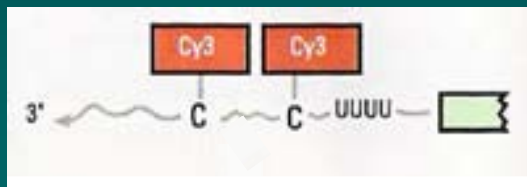
◆ Esecuzione dei saggi di citotossicità (MTT, Neutral Red ed Alamar Blue) sulla linea cellulare di Oncorhynchus mykiss prescelta utilizzando le sostanze tossiche di riferimento.

# Esperimento di microarray: approccio 1 colour

mRNA



Marcatura con Cy3



Slide



La slide è un semplice vetrino su cui sono depositate sequenze date da 60 nucleotidi a formare una piccola area circolare (spot) ciascuna rappresentativa di ogni singolo gene.

Scanner



I vetrini vengono poi letti dallo scanner per microarray uno strumento dotato di laser specifici per eccitare i fluorocromi impiegati quindi rilevarne l'emissione in fluorescenza.

# mRNA

- ◆ Prelievo d'organo e stoccaggio in azoto liquido ai tempi e dosi prescelti
- ◆ Estrazione dell'mRNA da organo e da colture cellulari, quantificazione e controllo qualità

**Nanodrop**



**2100 Bioanalyzer**



# Slide

•9152 cDNA nylon slide, INRA, France  
•147 cDNA glass slide, Pacific Environmental Science Centre, Canada

- ◆ Non esistono slide commerciali per *Oncorhynchus mykiss* e *Dicentrarchus labrax* e il loro genoma è solo parzialmente sequenziato (2009).
- ◆ Per *Oncorhynchus mykiss* esiste un progetto **genoma che ha portato all'elaborazione circa 40000 Tentative Consensus sequences**, cioè assemblaggi di trascritti verificati per la corrispondenza ad un prodotto proteico
  - annotazioni funzionali sono curate dal Laboratorio di Computational Biology and Functional Genomics **dell'Università di Harvard** (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/tgipage.html>).
- ◆ Disegnare una slide per *Oncorhynchus mykiss* (e-array, Agilent)
- ◆ La tecnologia Agilent: sure-print inkjet technology, oligonucleotidi 60mer



# Precedente esperienza: slide per *V. fischeri*

- ◆ Software per il disegno degli oligonucleotidi dedicati alla espressione genica di *Agilent : Nearest Neighbour*" - SantaLucia 98
  - Il ceppo di cui è stato pubblicato l'intero genoma è il *V.fischeri ES114*, isolato dall'organo luminoso della seppia *Euprymna scolopes*
  - Selezione Best Probe
  - Controllo cross-hybrid con Olicheck
- ◆ Il formato della slide è 8X15K e include:
  - Tre repliche dell'intero genoma di *V. fisheri* (3747 probe 60mer)
  - Controlli positivi e negativi
  - 371 probe contro *V. cholerae* (controllo addizionale di specificità)
- ◆ I profili trascrizionali ottenuti dall'analisi microarray riescono inoltre a classificare con alta efficienza le matrici contaminate da FB1 ed FB2 rispetto alle non contaminate. Questi risultati mettono in evidenza le potenzialità che le tecniche tossicogenomiche hanno rispetto al Microtox Test System, soprattutto nell'intervallo delle "basse dosi".

# Studio dell'espressione genica in *Dicentrarcus labrax*

- ◆ Anche per *Dicentrarcus labrax* non sono disponibili slide commerciali per lo studio dell'espressione genica (2009).
- ◆ L'unico gruppo francese che ha utilizzato approcci trascrizionali per lo studio dello sviluppo larvale nel branzino ha impiegato l'ibridazione eterologa, cioè ha utilizzato sonde di trota iridea per riconoscere i geni di branzino (Darias M.J. et al., 2008).
- ◆ L'efficienza dell'approccio cross-species è già stata verificata a livello della sottodivisione Euteleostei nell'ambito del Programma Nazionale Francese, Genofish, proprio per *Oncorhynchus mykiss* versus *Dicentrarcus labrax*.
- ◆ Riteniamo perciò che la slide che intendiamo sviluppare per *Oncorhynchus mykiss* possa essere testata anche su *Dicentrarcus labrax* con la possibilità quindi di estendere lo studio dei contaminanti di riferimento anche alla specie autoctona.



# Main stones

Identificazione di un profilo trascrizionali in risposta a contaminanti di riferimento nella specie *Oncorhynchus mykiss* ancorando l'espressione genica all' end-point di ecotossicità in vivo



Verifica dei profili di espressione in risposta a contaminanti di riferimento nel sistema cellulare in vitro



Verifica dei marcatori trascrizionali in risposta a contaminanti di riferimento nella specie autoctona *Dicentrarcus labrax*, ancorando l'espressione genica all' end-point di ecotossicità



Analisi statistica ed interpretazione biologica dei dati di microarray

# No-Observable-Transcriptional-Effect Level (NOTEL)

- ◆ Per integrare gli studi di espressione genica nel monitoraggio ambientale anche a fini regolatori, è stata recentemente proposta, come sistema per la valutazione della tossicità dei composti chimici, la NOTEL (Poyntn et al., 2008).

Definire la risposta trascrizionale a dosi differenti (basse dosi)



Si definisce la curva dose-risposta sulla base di un modello statistico (generalized linear model with binomial family)



Si stima la massima concentrazione di composto a cui meno del 5% dei geni sono differenzialmente espressi rispetto al controllo

- ◆ Confronto NOTEL con le informazioni derivanti dagli altri livelli di studio

# Qualità dei dati:MIAME

- ◆ Tutti gli esperimenti di microarray verranno condotti secondo le linee guida MIAME **Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)** definite dalla Microarray Gene Expression Data Society (1999).
- ◆ Queste linee guide garantiscono la qualità dei dati e contemplano tutti gli step dell'analisi trascrizionale, dal disegno sperimentale all'analisi statistica.
- ◆ Il soddisfacimento dei requisiti definiti dalle linee guida viene verificato riportando i dati di microarray in data-base MIAME compatibili ([Array Express](#), EBI (UK), [GEO](#) at NCBI (US) and [CIBEX](#) at DDBJ (Japan) che verificano, accettano, conservano e rendono disponibili i dati di microarray conformi.

# Obiettivi a livello di rete

- ◆ Definizione di un network di laboratori ARPA/ISPRA in grado di effettuare i test in vivo e in vitro **propedeutici all'analisi trascrizionale**
- ◆ Formazione per tutte le Agenzie Regionali che lo richiedono
- ◆ Offerta servizi a clienti privati

# Il nostro gruppo



**Elena  
Morandi**



**Daniele  
Quercioli**



**Maria Grazia Mascolo**



**Stefania Perdichizzi**



**Francesca Rotondo**



**Monica  
Vaccari**



**Annamaria  
Colacci**

**Grazie per l'attenzione**