

Elena Morandi ^a, Daniele Quercioli ^a, Pier Luigi Trentini ^b, Maria Grazia Mascolo ^a, Francesca Rotondo ^a, Angela Guerrini ^a, Monica Vaccari ^a, Graziella Mirolò ^b, Federica Savorelli ^b, Donatella Palazzi ^b, Manorama Croppo ^b, Stefania Perdichizzi ^a e Annamaria Colacci ^a

^a Centro Tematico Regionale - Tossicologia ambientale, Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell' Emilia Romagna

^b Laboratorio Integrato – Sezione Provinciale di Ferrara, Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell' Emilia Romagna

Introduzione

Il Regolamento (CE) n. 1907/2006 del 18 dicembre 2006 (REACH) modifica radicalmente la disciplina per l' immissione in commercio delle sostanze chimiche, con l' obiettivo di assicurare un maggiore livello di protezione della salute umana e dell'ambiente, garantendo, nel contempo, la libera circolazione delle sostanze nel mercato interno e rafforzando la competitività e l'innovazione dell' industria chimica europea. Un importante aspetto del Regolamento è quello di promuovere metodi alternativi alla sperimentazione sugli animali.

Il progetto quindi si propone due **obiettivi** fondamentali:

L'applicazione della **trascrittomica** all'ecotossicologia, 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

Lo sviluppo di una **metodologia per la valutazione di una dose** che non ha effetto trascrizionale (NOTEL), da comparare con i valori della concentrazione che non determina effetti osservabili (NOEC) dedotta dagli altri approcci sperimentali.

Risultati

Applicazione della trascrittomica all'ecotossicologia

1. Disegno e realizzazione di vetrini microarray

Piattaforma Agilent

Slide 8x60k



Oncorhynchus mykiss



Rainbow Trout
Gene Index Database
(RtGi)

Dicentrarchus labrax



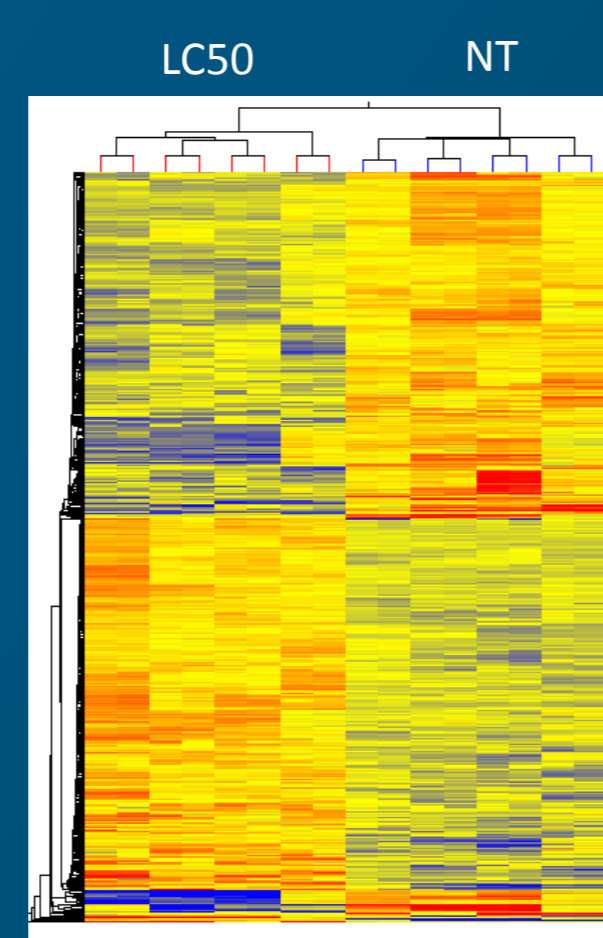
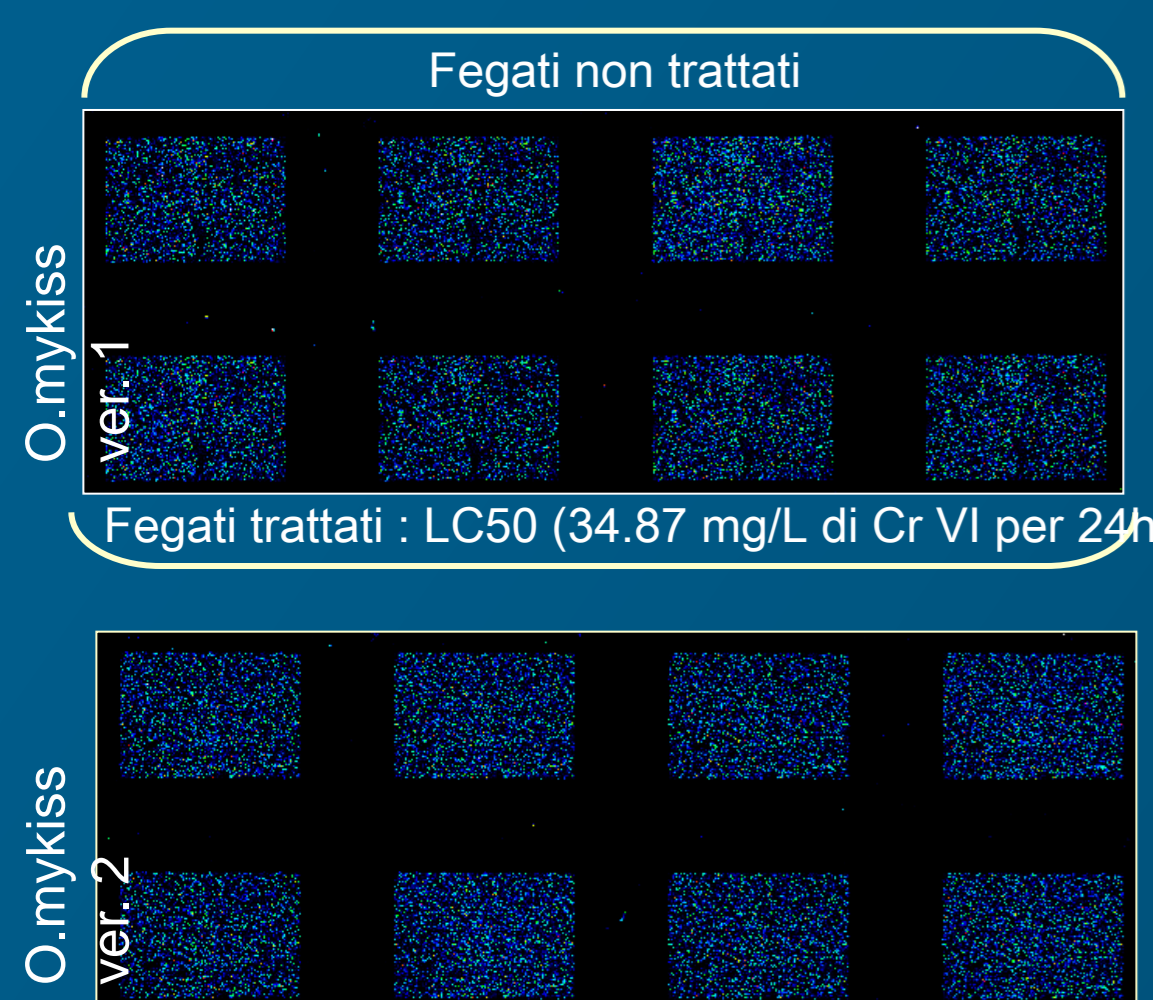
Dicentrarchus labrax contig database presso il Sigenae (Système d'Information des GENomes des Animaux d'Élevage) e Dlabrax_OldArray" (Ferrareso, 2010)

sonde uniche utilizzate nel disegno del vetrino :45527

sonde uniche utilizzate nel disegno del vetrino 29397

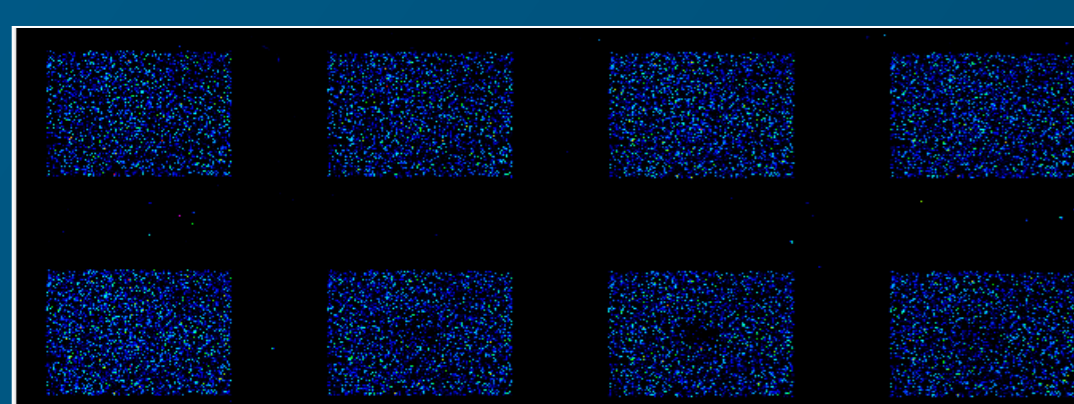
2. Valutazione delle slide ibridate con RNA ottenuto da fegato ottenuto dalle due specie

Oncorhynchus mykiss



Evidenti distinti profili trascrizionali
Con 2603 geni differenzialmente espressi
(T-test unpaired corrected p≤0.05)

Dicentrarchus labrax



Sono stati utilizzati soltanto gli RNA ottenuti da fegati di branzino DLabrax non trattati

Sviluppo di una metodologia per la valutazione della NOTEL

NOTEL: No Observed Transcriptional Effect Level

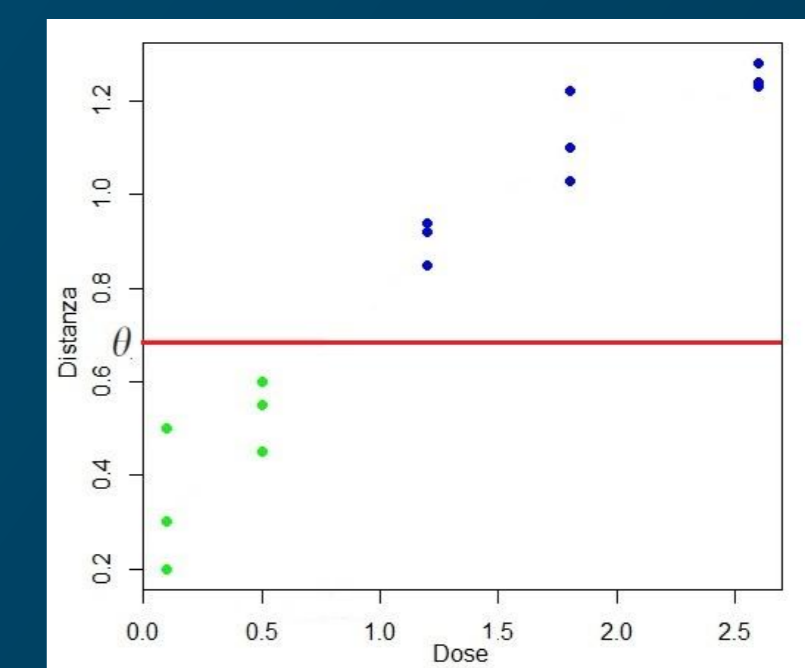
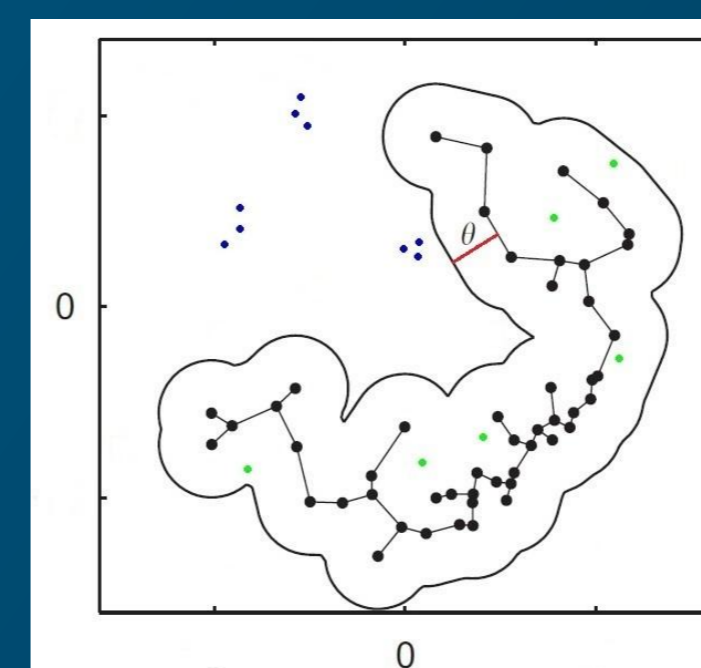
Lacune principali dei metodi basati sulla proporzione dei geni differenzialmente espressi

- ❑ non considerare il livello di modulazione dei geni in fase di valutazione della dose-risposta
- ❑ scarsi design sperimentali conducono ad un più alto valore della NOTEL

Metodologia di valutazione della NOTEL che considera non più semplicemente il numero di geni modulati ma il loro **profilo di espressione** basata su una tecnica di **one-class classification** con approccio domain-based (Minimum Spanning Tree Class Descriptor) utilizzabile in applicazioni di **Anomaly Detection**

Fasi principali

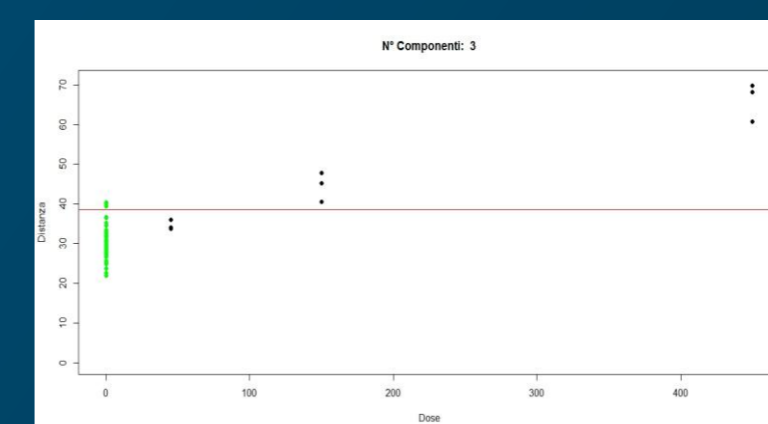
- **Analisi della Varianza** → geni modulati
- **Definizione del dominio NT**
- **Analisi Dose-Risposta**



Prove con Dataset TGP (Giappone)

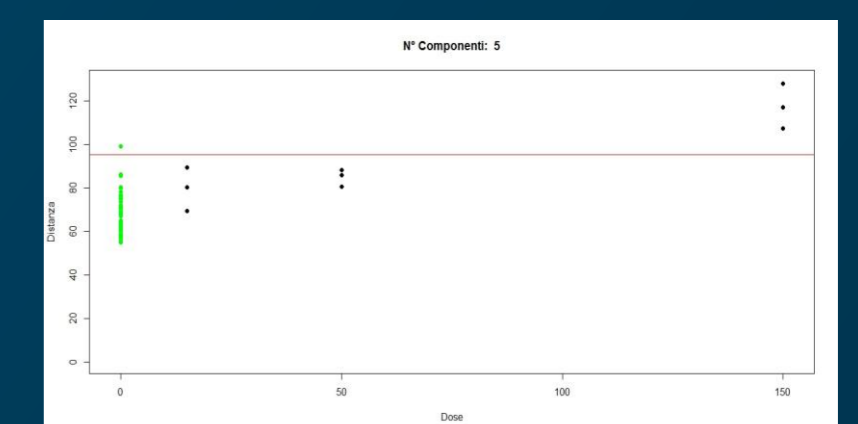
- ✓ Microarray Affymetrix GeneChip
- ✓ Training Set: 200 NT
- ✓ Test Set: 57 NT

Aspirina



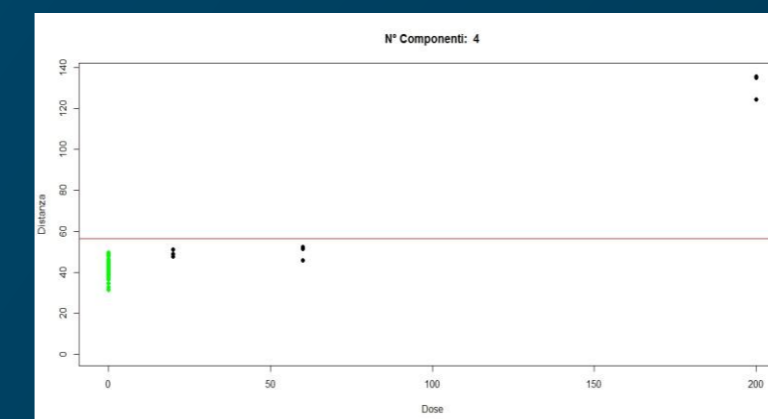
Errori su Test Set: 3 / 57 (5.26%)

Allopurinolo



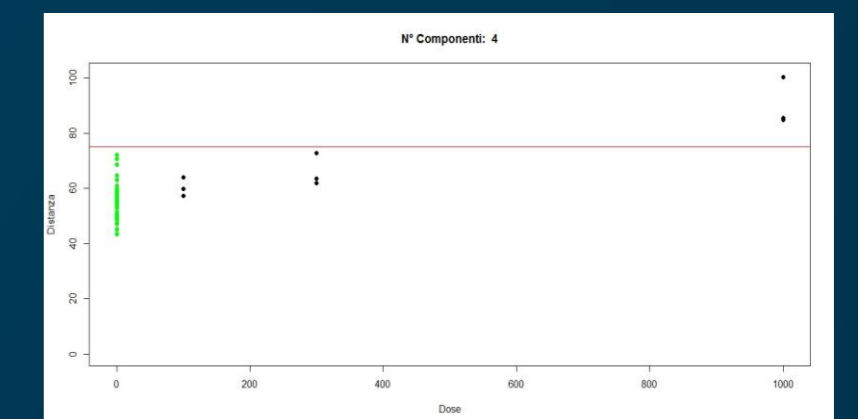
Errori su Test Set: 1 / 57 (1.75%)

Amiodarone



Errori su Test Set: 0 / 57 (0%)

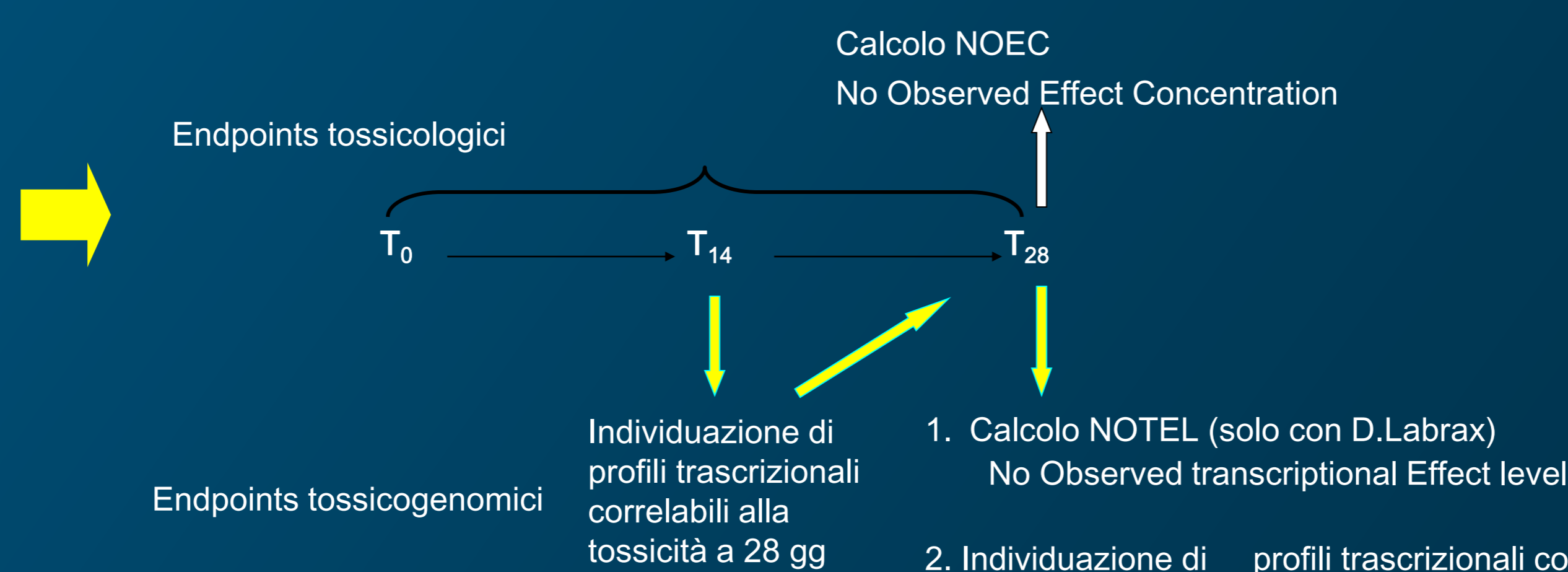
Sulfasalazine



Errori su Test Set: 1 / 57 (1.75%)

Test C14: crescita dei pesci giovani Reg. CE n.440/2008

Disegno sperimentale:
test a 28 giorni su
O. Mykiss e D. Labrax



Stato dell'arte

Estrazione di RNA da fegato delle due specie ittiche dopo trattamento con 4 dosi di Cr esavalente