Tossicogenomica:un nuovo strumento di indagine scientifica nel rispetto del benessere animale

Laura Gribaldo

Milano, 5 Giugno 2012

❖**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.**

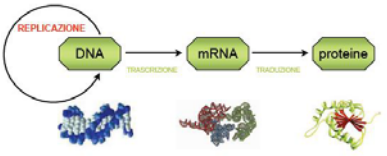
❖**La tossicogenomica consiste nella applicazione delle tecnologie genomiche alla tossicologia per studiare gli effetti avversi dei composti chimici**

- ***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***

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.

Le tecnologie tossicogenomiche



Trascrittomica

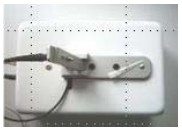
•La branca più avanzata della tossicogenomica
•Vasta applicazione in oncologia
•Definizione dei profili e MOA dei composti chimici
• A supporto dell'indagine istopatologica

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



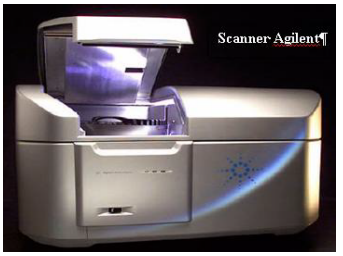
2100 Bioanalyzer

Esperimento di microarray: approccio 1 colour

mRNA

Marcatura con Cy3

Scanner



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.

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.

Ostacoli nell'implementazione della tossicogenomica

•Migliaia di alterazioni molecolari in un singolo esperimento sono transitorie e spesso non rilevanti agli effetti di monitorare la tossicita'

•La quantita' di dati generata non puo' essere analizzata con le tecniche correnti

•Non esistono "gold standard"per questa tecnologia e quindi al momento non si possono equiparare studi condotti utilizzando piattaforme diverse

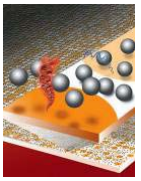
•Non esistono risorse sufficienti per collezionare l'informazione in modo da analizzare in modo comparativo dati prodotti su specie diverse, in studi diversi o utilizzando parametri tossicologici diversi

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.

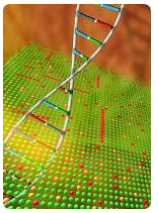


Joint Industry Project

- Determinare la riproducibilita' e la robustezza dei dati
- Valutazione riproducibilita' intra- and inter-lab Valutazione modelli cellulari
- Collaborazione con industria chimica per evidenziare l'applicazione della tossicogenomica in ambito di valutazione del rischio

LGC Setting standards in analytical science

Unilever The University of Nottingham UNITED KINGDOM - CHINA - MALAYSIA

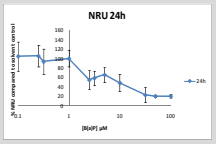


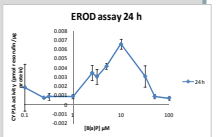
- **a) Cytotoxicity**

LGC (IHCP, FRAME)

HepG2

0.1-100uM B[a]P
24/48 hours

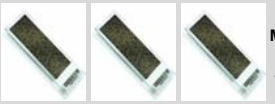




b) Toxicogenomics

HepG2

3uM B[a]P
24 hours



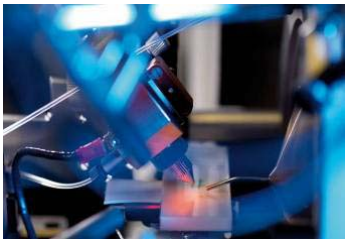
Microarray
Agilent
4x44k array

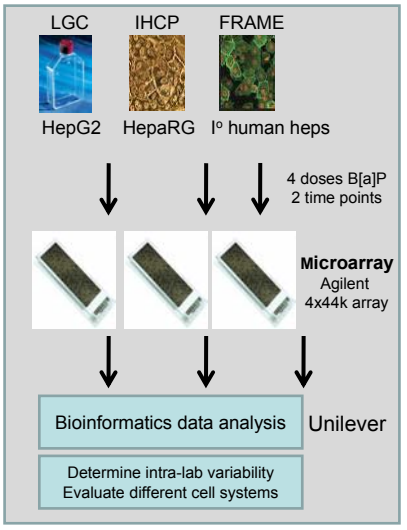
Bioinformatics data analysis

Unilever

Determine inter-lab variability

• **B[a]P dose initially determined by cytotoxicity assays for HepaRG and primary human hepatocytes**





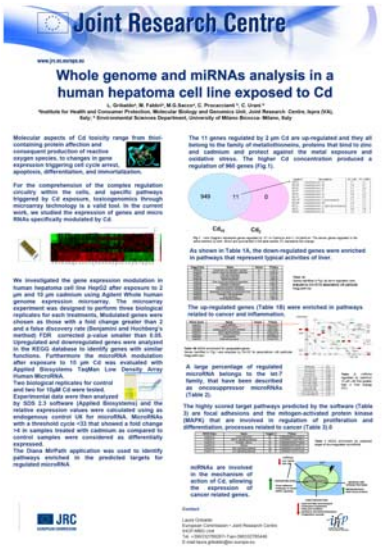
Problemi da risolvere

•Identificare il profilo molecolare di composti chimici e farmaci tra specie diverse ed in funzione di esposizione e severita' degli effetti

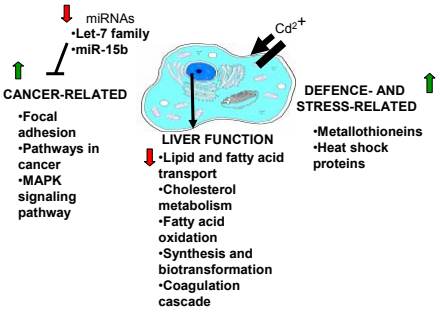
•Mettere in relazione questo con il fenotipo usando I metodi convenzionali

•Chiarire se le risposte sono di tipo adattativo o di natura patologica, identificare biomarcatori, eventi chiave e modalita' d'azione.

•Necessita' di applicare strumenti computazionali, dati di riferimento, conoscenze



Identification of adverse pathways

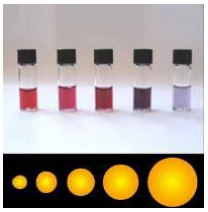


European Commission

Prossimo obiettivo progetto di ricerca esplorativa:

Studio dell'espressione genica di un modello cellulare esposto *in vitro* a nanoparticelle d'oro

- Uso di nanoparticelle di diverse dimensione
- Indagine dell'intero trascrittoma
- Associazione con studi di tossicita' e uptake quantitativo



Grazie della vostra attenzione!