

Contaminazione di specie ittiche :

identificazione di biomarcatori di effetto

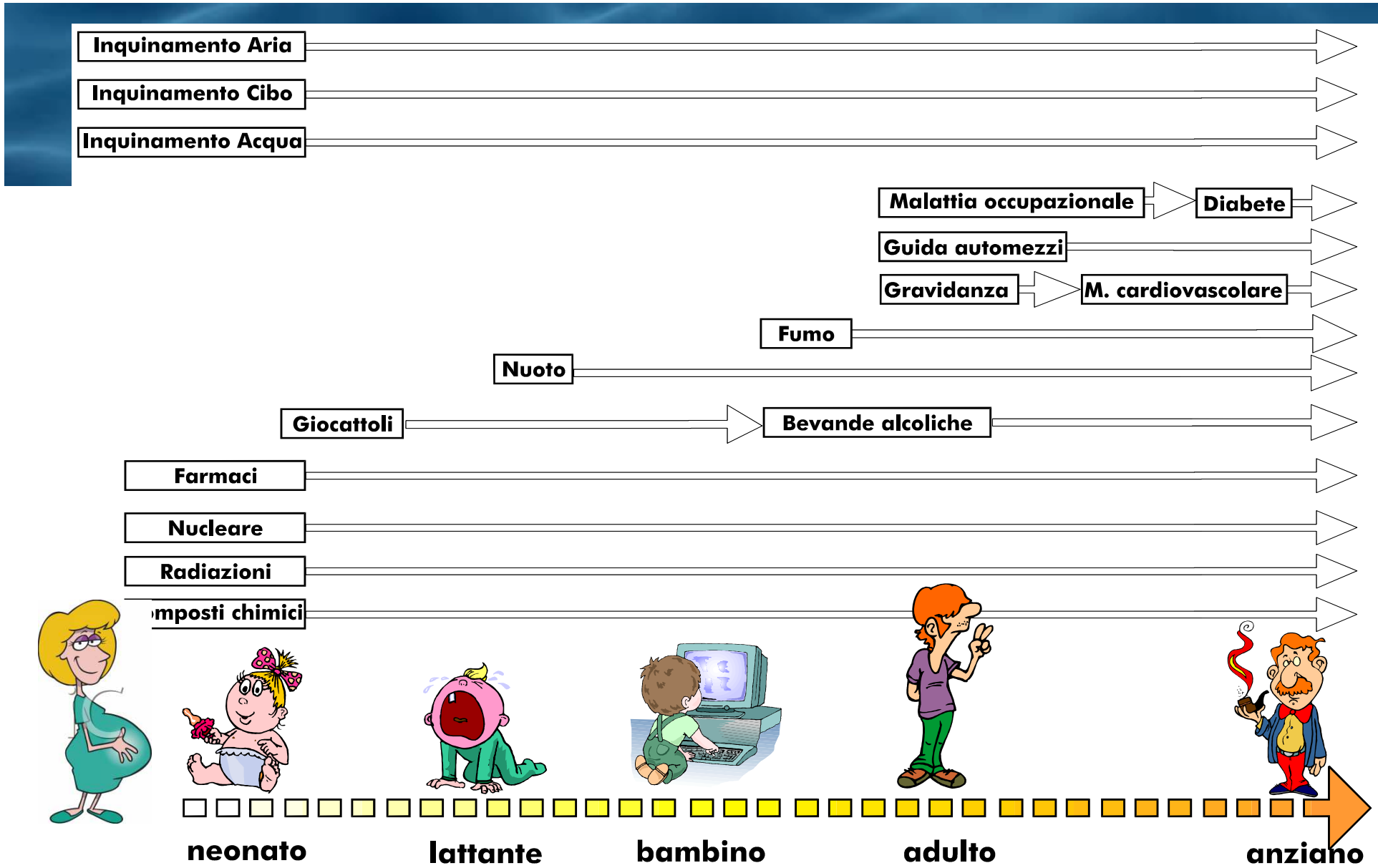
Annamaria Colacci

Centro Tematico Regionale Cancerogenesi
Ambientale e Valutazione del Rischio

ARPA Emilia-Romagna

L'importanza della matrice alimentare

- La matrice alimentare costituisce la maggiore fonte di esposizione ambientale



Siamo quello che mangiamo

- Dis-moi ce que tu manges, je te dirai ce que tu es
 - Anthelme Brillat-Savarin *Physiologie du Gout, ou Meditations de Gastronomie Transcendante, 1826*

Alimentazione ed evoluzione (1)

- L'alimentazione costituisce il piu' forte fattore di pressione selettiva
- Dal punto di vista genetico l'uomo oggi vive in un ambiente nutrizionale molto diverso da quello che la nostra costituzione genetica ha selezionato
- Gli studi di evoluzione nutrizionale sottolineano che le maggiori deviazioni sono a carico degli acidi grassi essenziali e sul contenuto di antiossidanti degli alimenti

Implicazioni

- L'outcome finale di ogni apporto nutrizionale e' il risultato di una complessa interazione fra geni e ambiente

Ambiente Antropico
• Trattamenti chimici
• Inquinamento

Ambiente Naturale
• Suolo
• Microclima

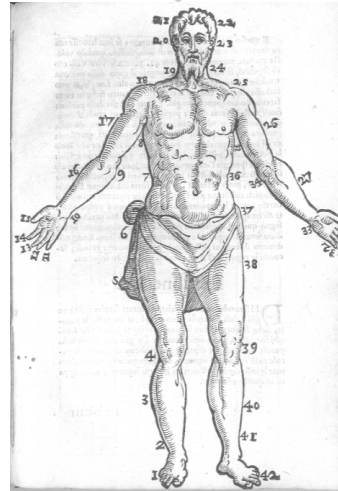
**Componente Genetica
Alimento**



Stili di Vita
• Fumo
• Alcool

Esposizioni
• Professionali
• Ambientali

**Componente Genetica
Soggetto**



Alimentazione e evoluzione (2)

- E' ben nota la stretta relazione fra stili alimentari e patologie cronico-degenerative

Mortalità ITALIA 2002

Rank	Cause di morte	No. decessi	%
1.	Patologie cardiovascolari	166.973	30.04
2.	Tumori	162.201	29.19
3.	Patologie cerebrovascolari	65.519	11.79
4.	Traumatismi	25.042	4.50
5.	Diabete mellito	17.514	3,15
6.	Patologie respiratorie croniche	16.782	3.02
7.	Influenza e polmonite	9496	1.71
9.	Nefriti	4006	0,72
10.	Avvelenamenti	638	0.01

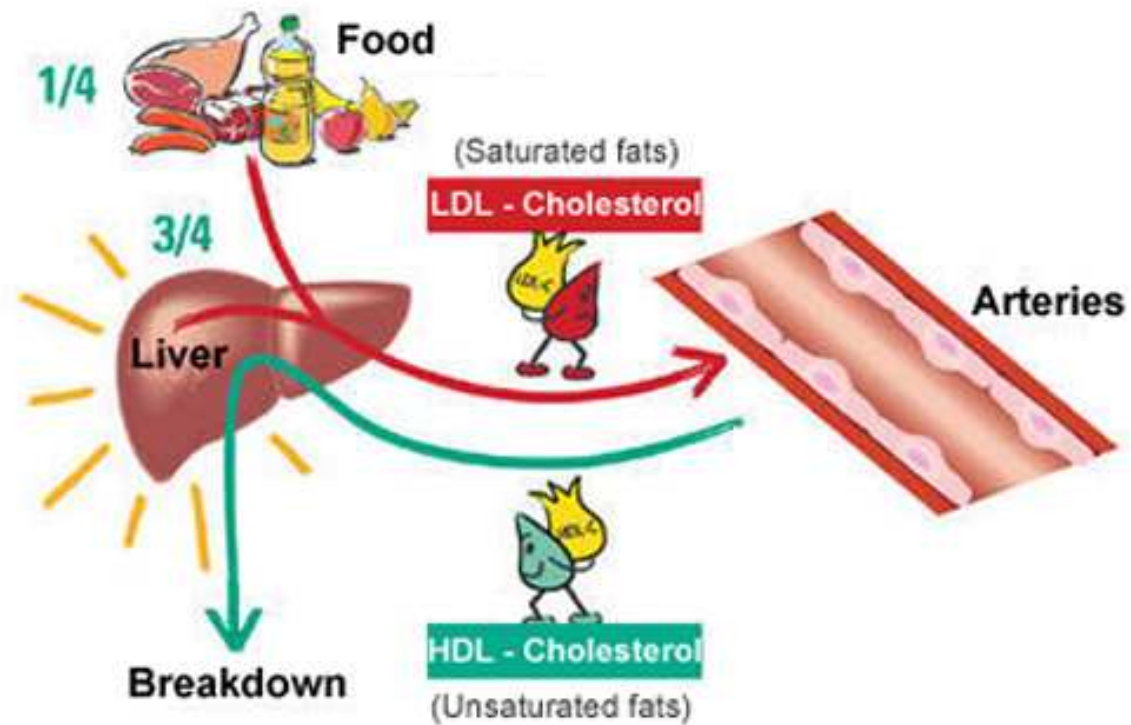
Fonte: ISTAT , ICD9CM.

Mortalità USA 2005

Rank	Cause di morte	No. decessi	%
1.	Patologie cardiovascolari	652,091	26.6
2.	Tumori	559,312	22.8
3.	Patologie cerebrovascolari	143,579	5.9
4.	Patologie respiratorie croniche	130,933	5.3
5.	Traumatismi	117,809	4.8
6.	Diabete mellito	75,119	3.1
7.	Alzheimer	71,599	2.9
8.	Influenza e polmonite	63,001	2.6
9.	Nefriti	43,901	1.8
10.	Setticemia	34,136	1.4

Fonte: US Mortality Data 2005, National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, 2008.

Alimentazione e aterosclerosi



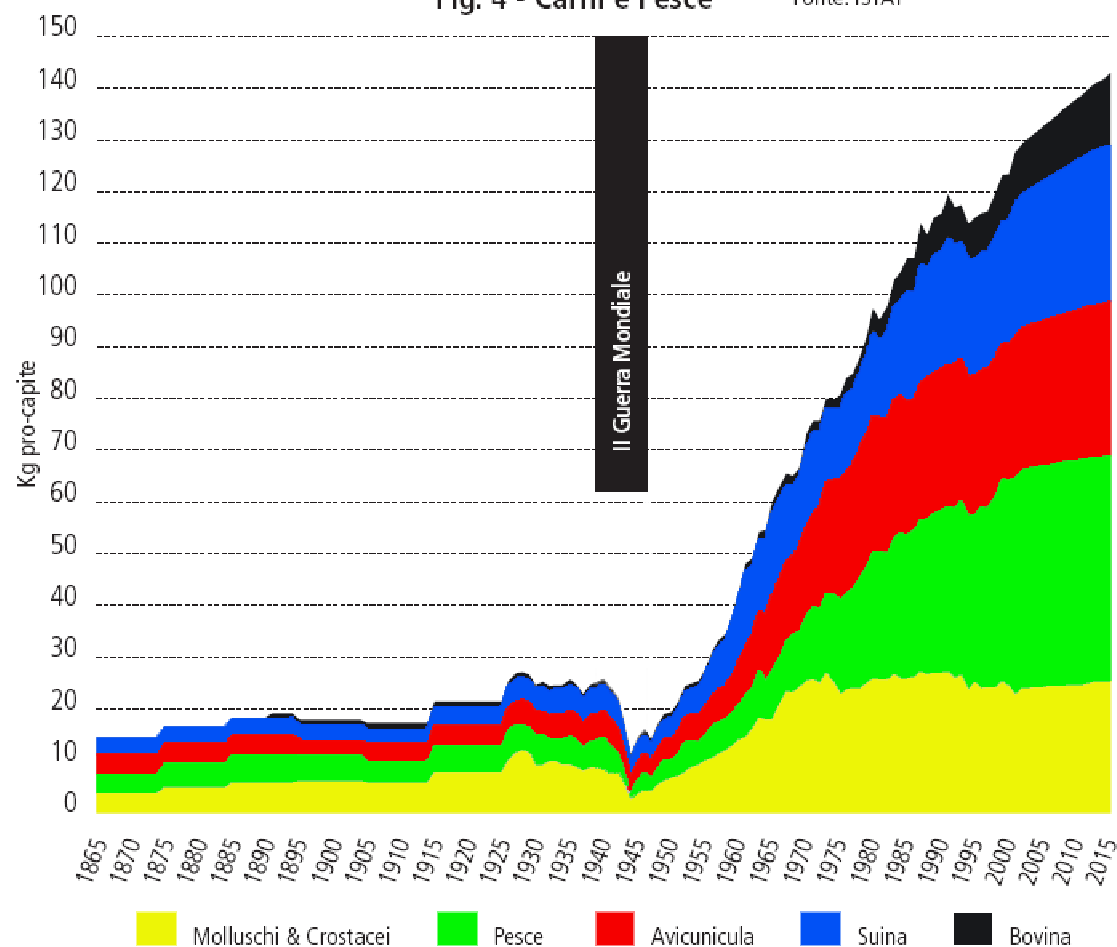
Fish is good for you!



Consumi alimentari in Italia

Fig. 4 - Carni e Pesce

Fonte: ISTAT

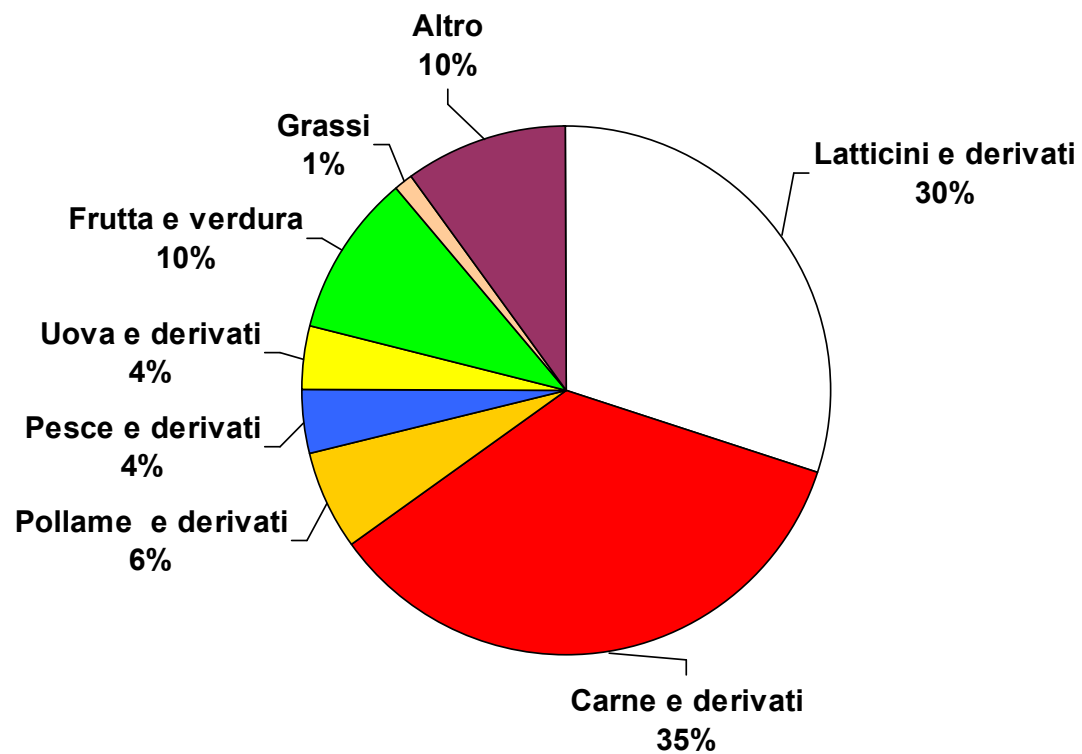


Fonte ISTAT

	EPA + DHA mg/porzione	EPA + DHA mg/100 g	Selenio ppm	Mercurio ppm	PCB ppb	Diossine
Vongole	241	284	0.54	<0,05	3 2	0.05 0.05 0.1
Granchio	351	413	0.4	0.09	6	0.55 1.05
Aragosta	71	84	0.43	0.31		0.69 0.12
Cozze	665	782	0.9	<0,15	7 0.8 2	0.09 0.11 0.07 0.39 0.45 1
Ostriche	585	688	0.77	<0,05	17 0.8	0.46 0.19
Gamberi	267	315	0.4	<0,05	2 0.2	0.06 0.11 0.06 0.19 0.08

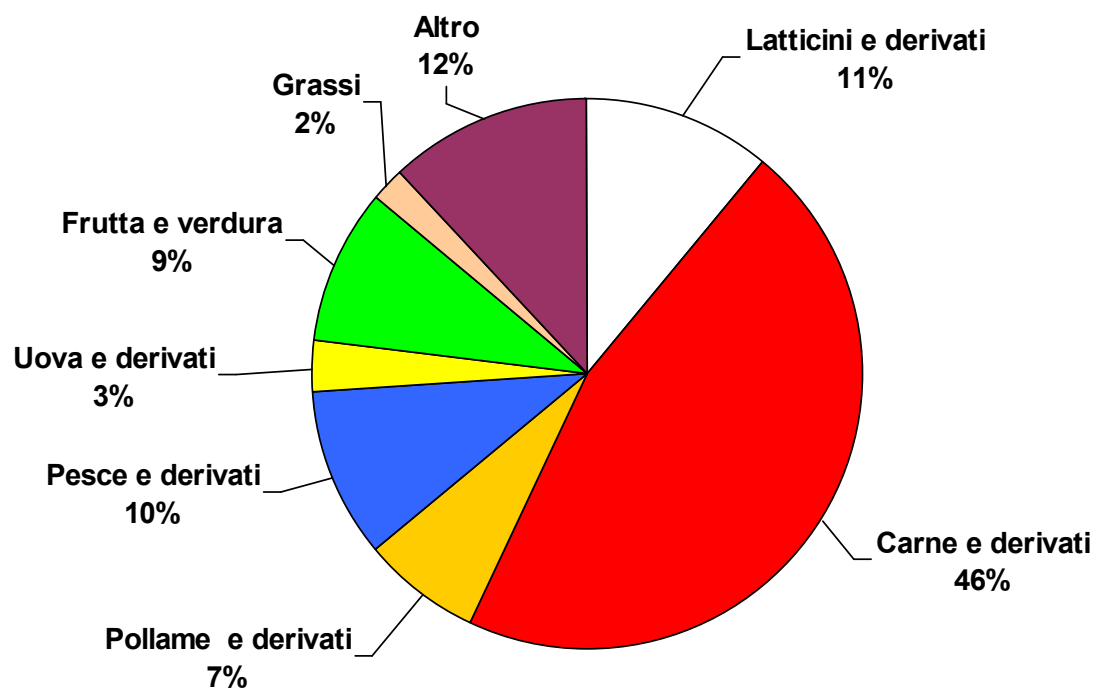
	EPA + DHA mg/porzione	EPA + DHA mg/100 g	Selenio ppm	Mercurio ppm	PCB ppb	Diossine
Acciughe	1165	2055	0.58	<0,05		0.35
Pesce gatto di allevamento	253	177	0.15	<0,05	<50	0.53
						0.51
						2.09
						1.65
Merluzzo, Atlantico	284	158	0.38	0.1		0.05
						0.15
Fish burger	337	546	0.17	<0,05	8	0.01
						0.11
Bastoncini di pesce, surgelati	193	214	0.17	<0,05		0.04
Persico spigola, Golfo Messico	1358	905	0.52	1.45		
Persico spigola, Atlantico	1358	905	0.52	0.14		
Halibut	740	465	0.47	0.25		1
Aringa Atlantico	1712	2014	0.47	<0,05		0.97
Sgombro Atlantico	1059	1203	0.52	0.05		0.87
						0.32
Sgombro Reale	618	401	0.47	0.73		
Lampuga	221	139	0.47	0.15		
Pollock dell'atlantico	281	468	0.43	<0,05		0.01
						0.24
Salmone, allevamento	4504	2648	0.41	<0,05	21	0.5
					15	0.87
					40	0.45
					26	0.33
					25	0.5
					51	
					38	
Salmone, selvaggio	1774	1043	0.46	<0,05	3	0.03
					0.5	0.34
					5	
Sardine	556	982	0.53	<0,05	57	0.44
					22	0.18
						0.6
Pesceccane	585	689	0.34	0.99		
Pagro	546	321	0.49	0.19		
Pesce spada	568	819	0.62	0.98		
Trota	581	935	0.15	0.07	11	0.56
						0.32
						0.74
						0.35
Tonnetto striato	228	270	0.8	0.12	45	0.02
Tonno a pinne gialle	733	862	0.86	0.35	100	0.23

Assunzione di diossine e composti diossino-simili attraverso l'alimentazione Bambini 1-5 anni



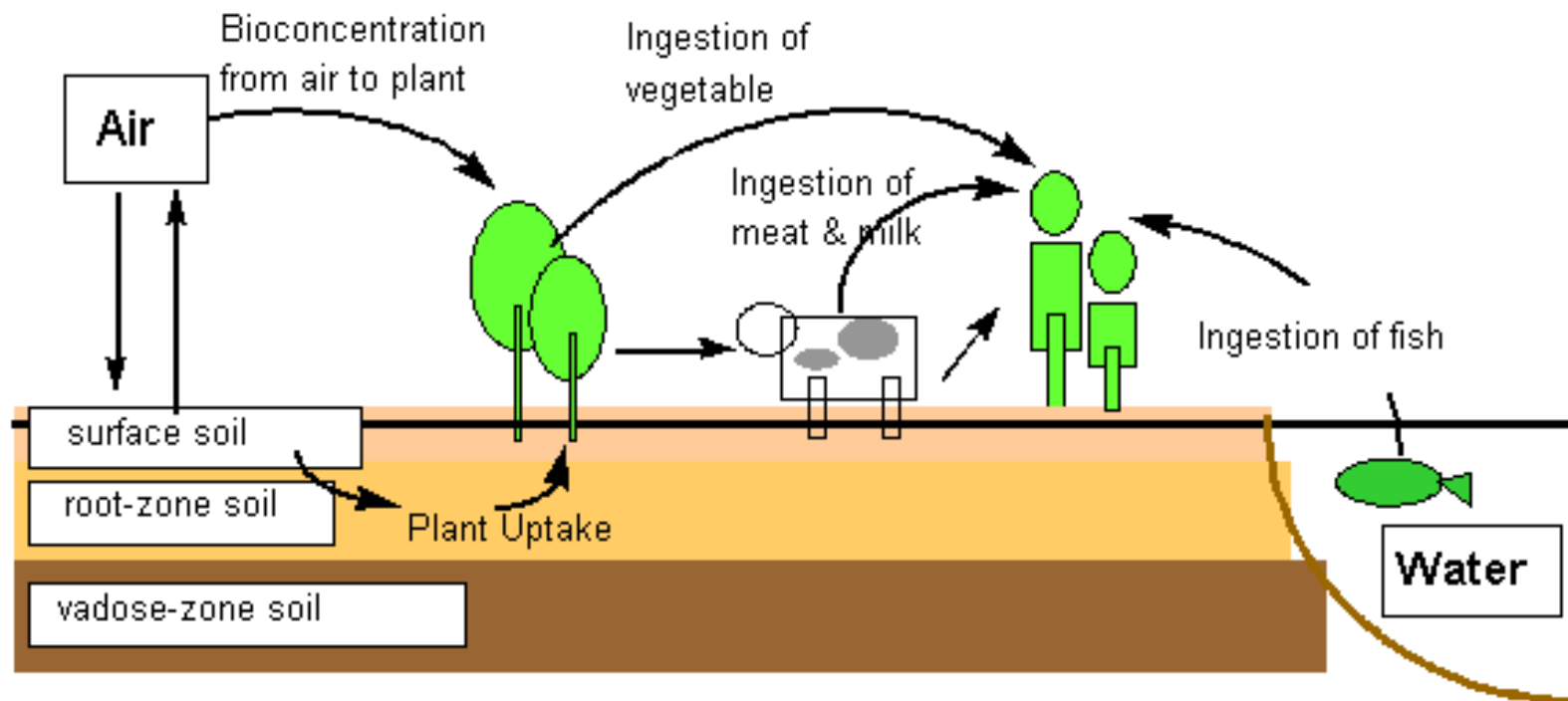
Fonte: USDA 2003

Assunzione di diossine e composti diossino-simili attraverso l'alimentazione Uomo > 20 anni

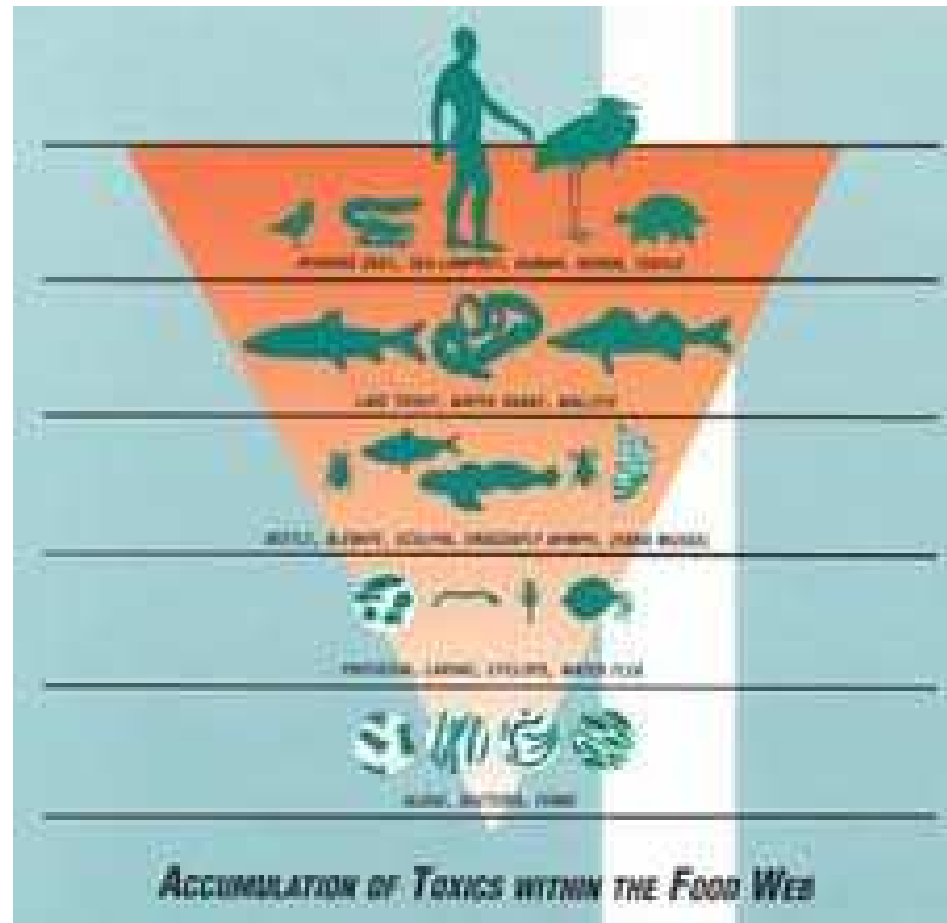


Fonte: USDA 2003

La catena della “contaminazione”

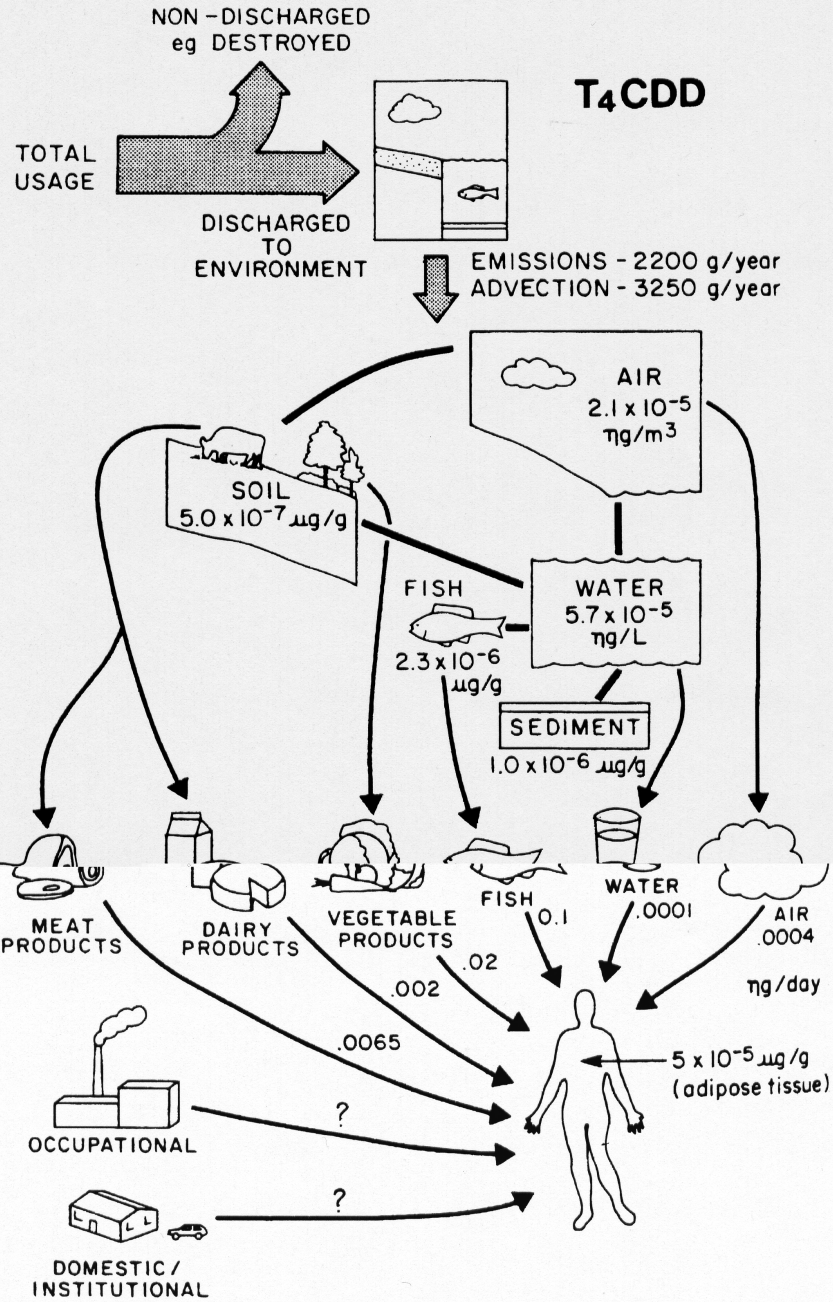


La piramide d'accumulo dei contaminanti



L'apice della catena





Dicentrarchus labrax



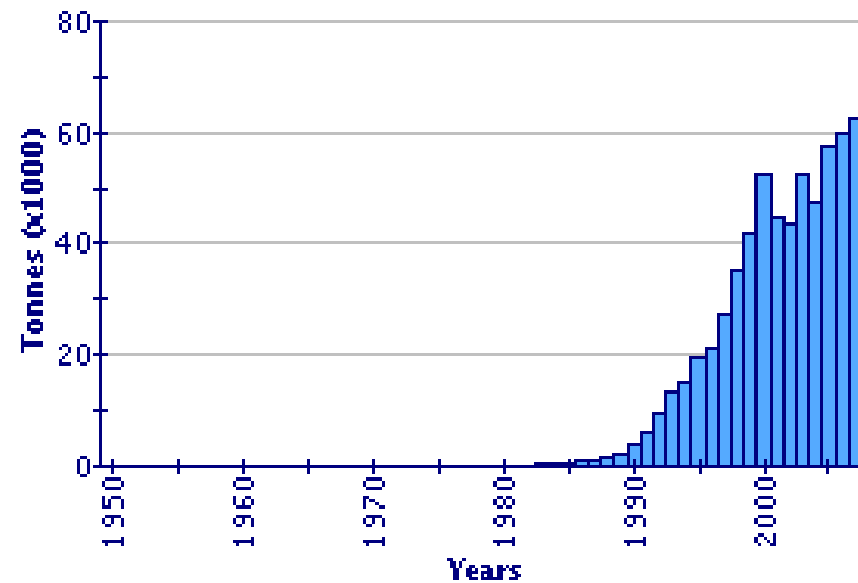
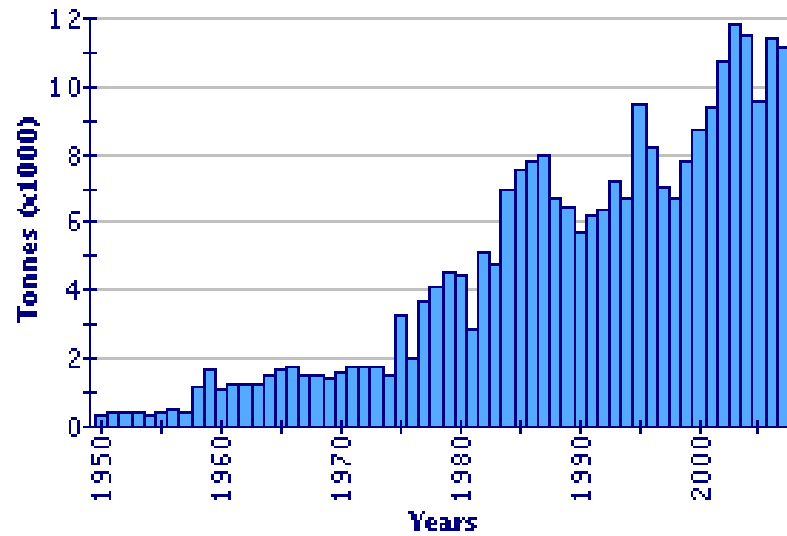
- Branzino
 - Specie diffusa in tutte le regioni tirreniche e adriatiche, con prevalenza per le foci d'acqua dolce, nell'Oceano Atlantico orientale e nel Mar Nero
 - È un veloce predatore principalmente notturno che si nutre di piccoli pesci (lattarini), anellidi, cefalopodi e crostacei
 - È un organismo eurialino, tollera molto bene i cambiamenti di salinità, ed è in grado di entrare spesso nelle lagune e risalire i fiumi per cercare delle prede

Dicentrarchus labrax



- Dal punto di vista della nutrizione
 - Specie molto apprezzata e ritenuta una delle più pregiate (e costose)
 - Il contenuto di omega3 è di 100 mg/100 g di prodotto pulito
 - Ha contenuto calorico relativamente basso
 - Ha un elevato contenuto di selenio
 - Ha un elevato contenuto di vit B6

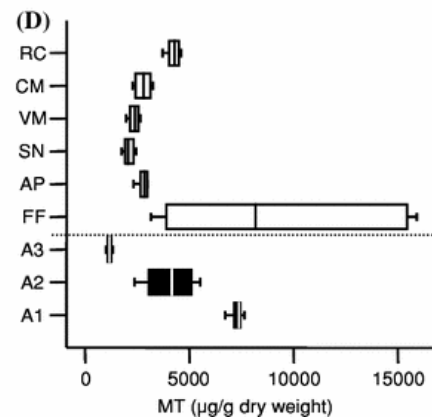
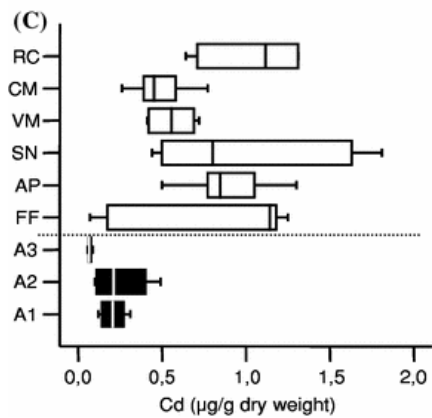
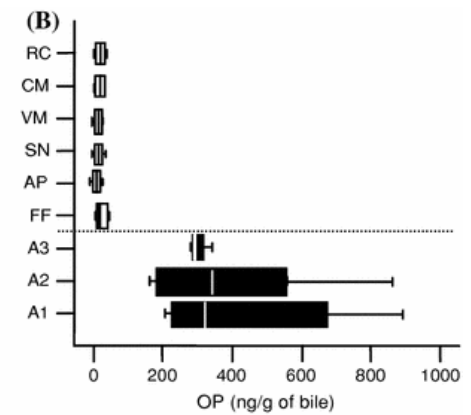
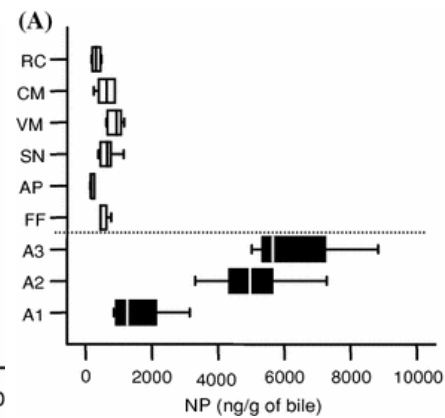
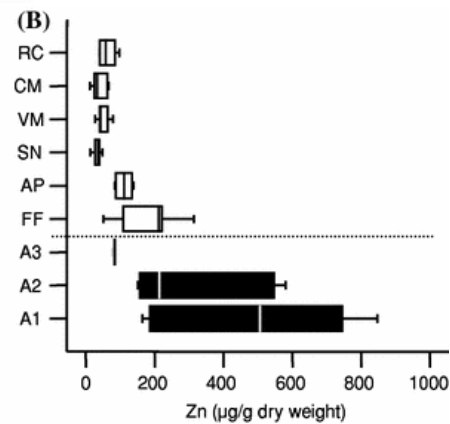
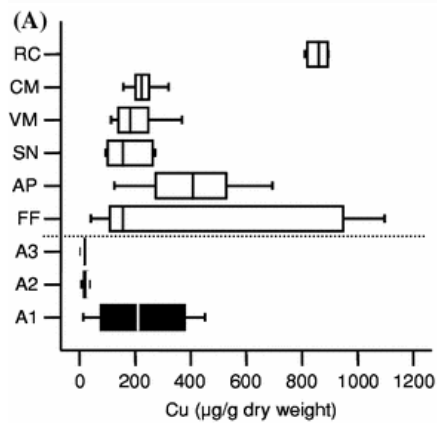
Pesca e acquacultura del branzino



Dicentrarchus labrax



- Dal punto di vista tossicologico



Fernandes et al. Ecotoxicology (2009)

Dicentrarchus labrax



- Dal punto di vista tossicologico

	Cultured sea bass	Wild sea bass	Diet pellets	References
ΣPCBs	7.0–19.0	–	1.4–2.3	Fernandes et al. (2008)
	19.5–32.5 ^a	–	–	Serrano et al. (2003)
	26.0–36.0	10.5–15.5	17.3–26.7	Antunes and Gil (2004)
	–	22.0–31.0 ^a	–	Antunes et al. (2007) Pastor et al. (1996)
	1.4–3.4	–	ND–2.9	Fernandes et al. (2008)
ΣDDTs	9.0–26.5 ^a	–	–	Serrano et al. (2003)
	22.0–39.0	3.1–7.7	19.6–25.9	Antunes and Gil (2004)
	–	13.0–20.0 ^a	–	Pastor et al. (1996)

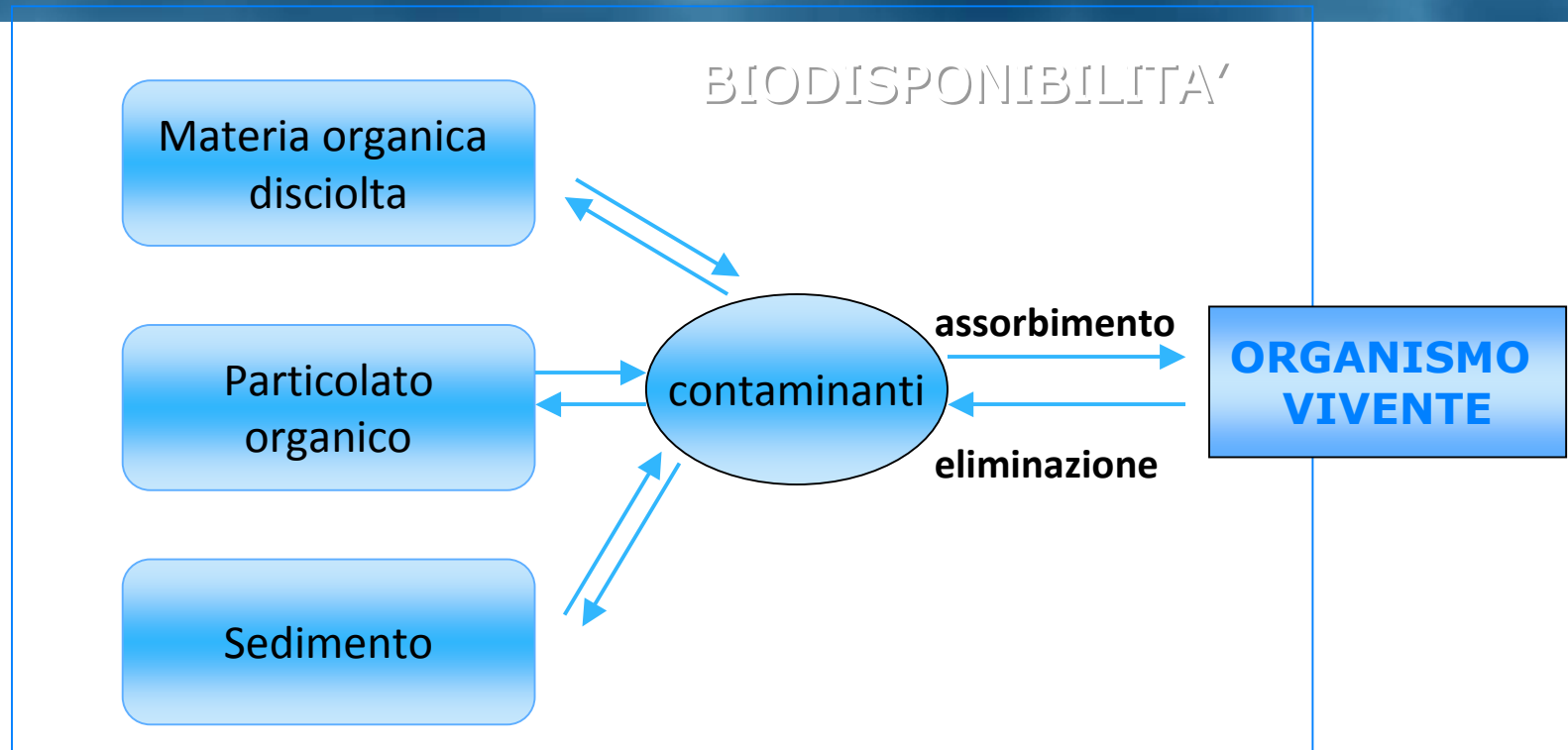
Fernandes et al. Ecotoxicology (2009)

Dicentrarchus labrax



- Dal punto di vista ecotossicologico
 - Il branzino costituisce un ottimo modello per studiare l'impatto ambientale di molti inquinanti delle acque
 - Molto sensibile anche a piccole variazioni di inquinanti (ad es. microinquinanti dei mangimi dei pesci in acquacoltura)

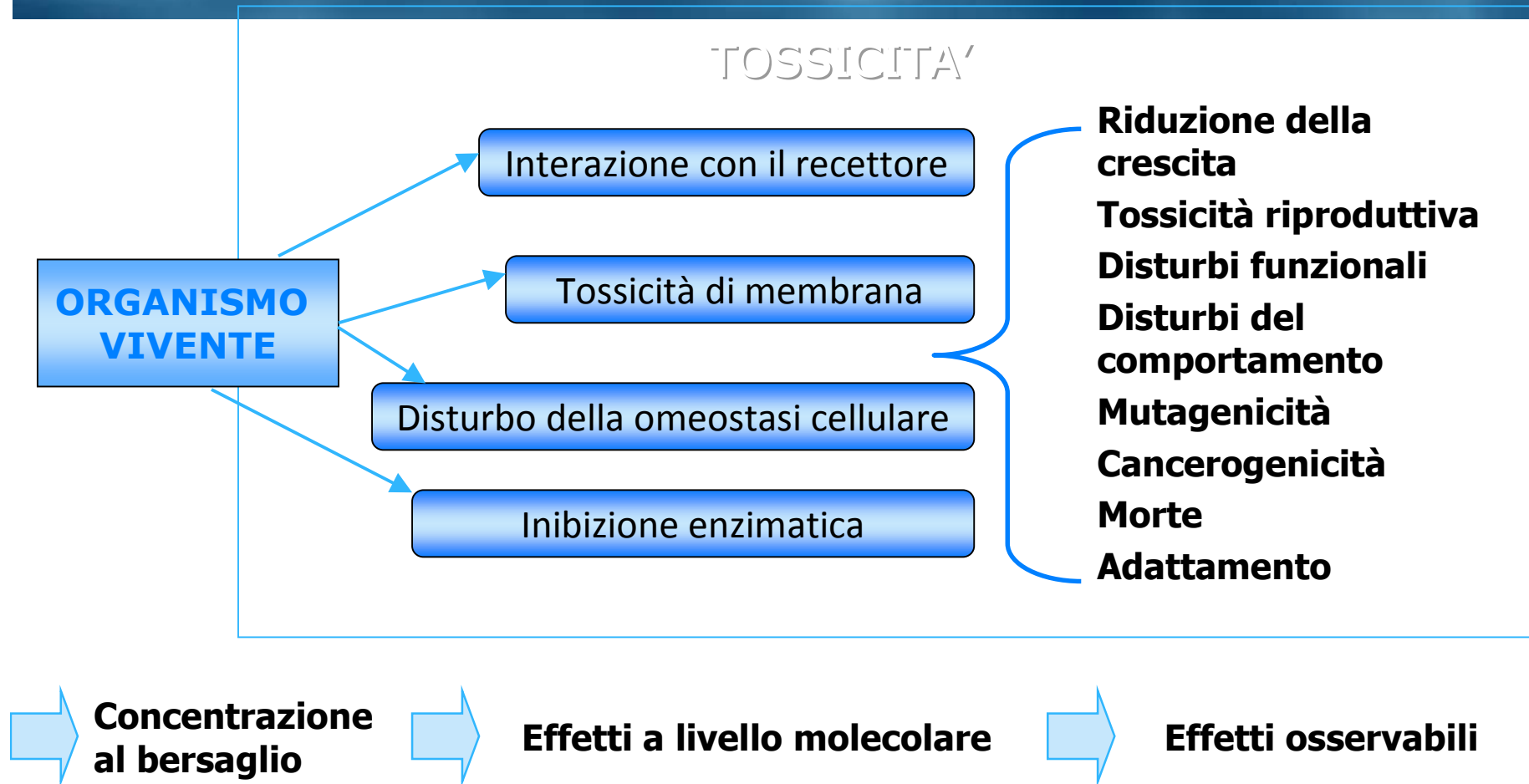
Dall'ecotossicologia.....

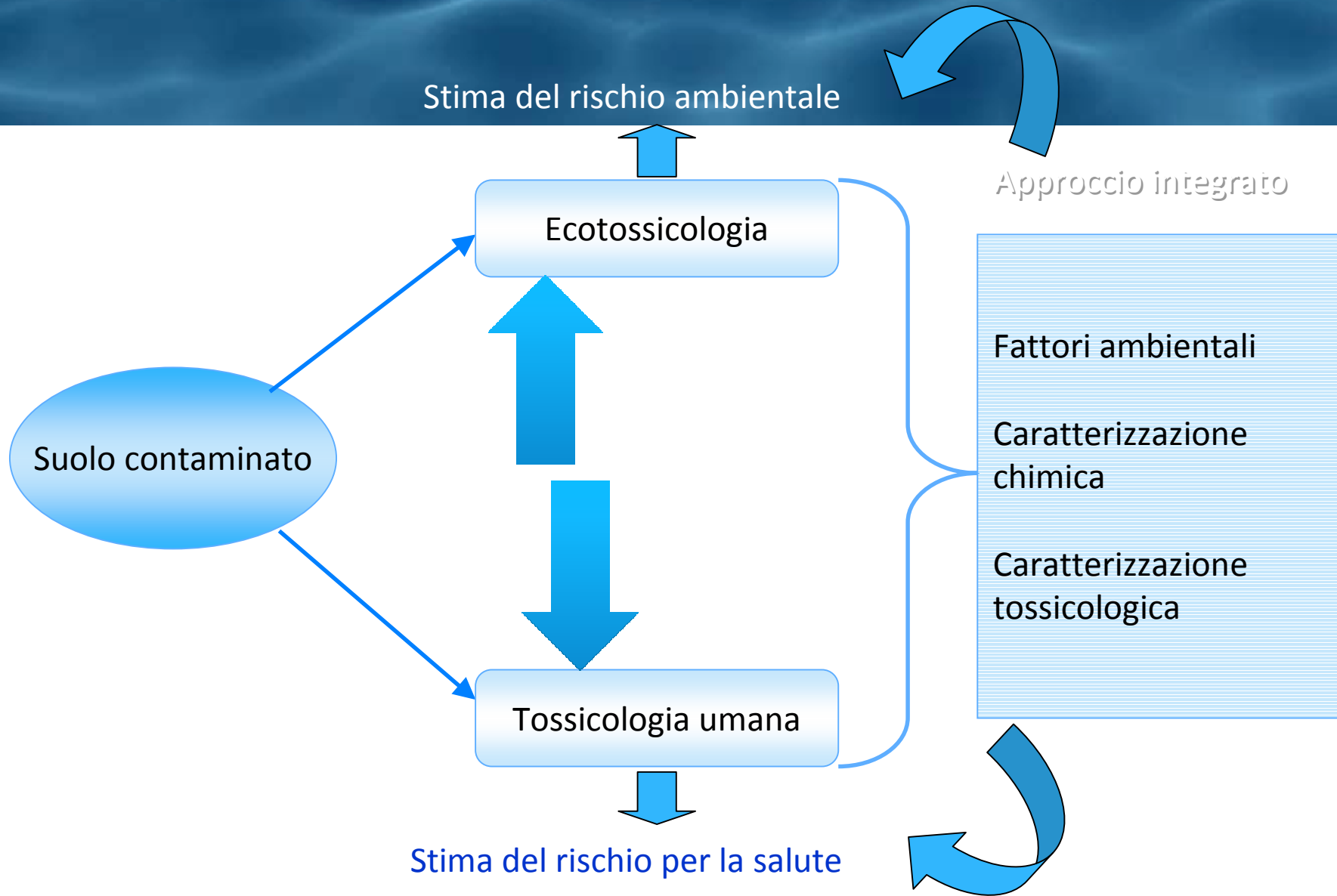


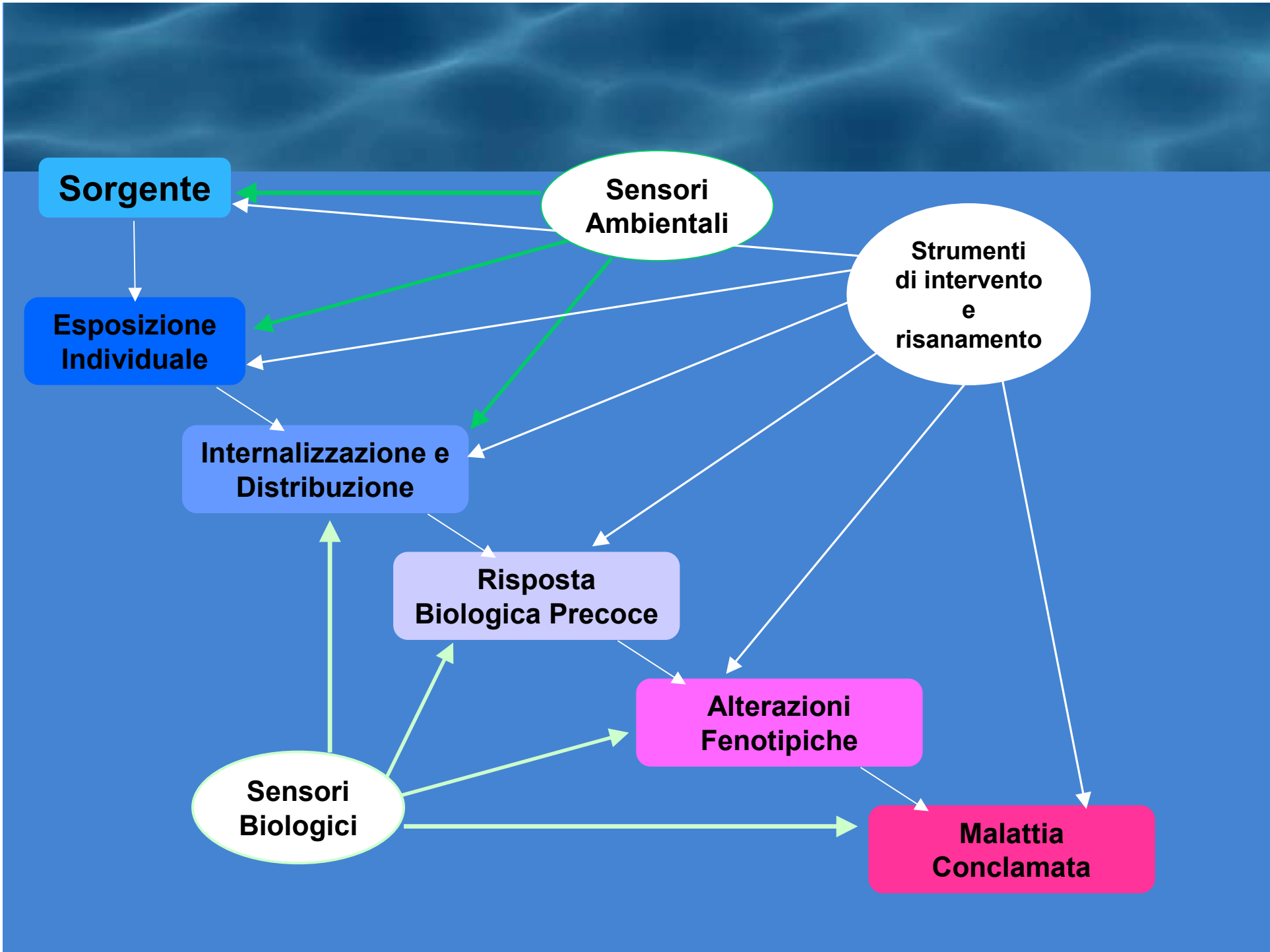
**Concentrazione
biodisponibile**



.....alla tossicologia







Le evidenze più nuove (ma già consolidate)

- Alcuni dei biomarcatori utilizzati in ecotossicologia e tossicologia umana condividono basi tecnologiche
- Per la identificazione e la determinazione spesso sono utilizzati gli stessi test in vitro

Il concetto di biomarcatore universale

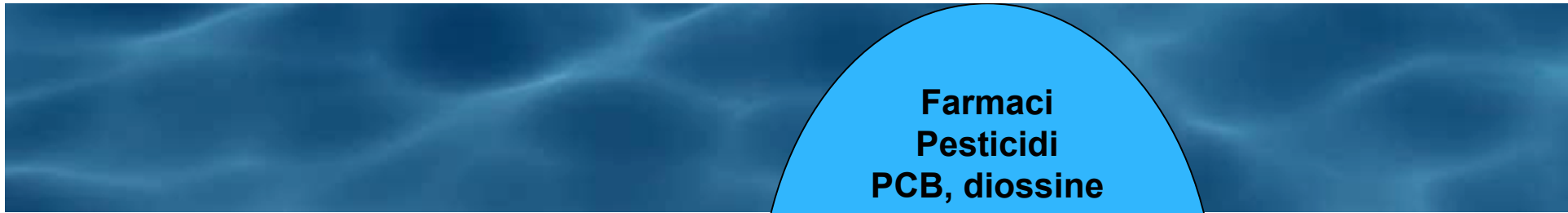
- Identificare risposte biochimiche a esposizione a tossici che siano universali in un range di organismi viventi
- Cercare strumenti che siano in grado di identificare biomarcatori negli organismi e in test di laboratorio

I goal da raggiungere

- Trovare strumenti comuni che possano funzionare nella pratica clinica, veterinaria, nel monitoraggio ambientale
- Seguire la risposta biologica dai microrganismi all'uomo
- Standardizzazione delle tecniche e dei linguaggi
- Accettare i test in vitro come strumenti comuni e surrogati sia per monitorare l'esposizione delle specie animali e dell'uomo
- Sviluppare una nuova visione per un approccio globale alla identificazione dei composti chimici nell'ambiente e alla tutela della salute umana

Una visione avveniristica?

- L'avvento delle nuove tecnologie omiche ha consentito di mettere in luce aspetti comuni nella risposta degli esseri viventi a determinati stimoli
- La presenza di proteine con sequenze altamente conservate dai microorganismi all'uomo è stata già dimostrata da una decina di anni
 - Es proteine adibite al trasporto dei metalli pesanti all'interno dell'organismo vivente

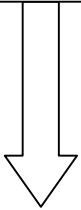


Farmaci
Pesticidi
PCB, diossine
IPA
Contaminanti aria
Metalli pesanti
Ormoni
Fenoli
Nutrizione
Comportamenti
parentali

DNA



RNA



PROTEINE

Traslocazioni geniche
Modificazioni istoniche
Metilazione DNA
Riparo DNA
Numero di copie gene
Attivazione trasposoni

Trascrizione

Stabilità RNA
Splicing alternativo
Retrotrasposoni

Fattori Trascrizione
Degradazione proteine



Ereditarietà
Sviluppo
Crescita
invecchiamento

Cancro
Obesità
Diabete
Sterilità
Malattie respiratorie
Allergie, risposta immunitaria
Disordini neurodegenerativi
Stress

Genomica e alimentazione

- La genomica ha portato un nuovo filone di ricerca nel campo dalla nutrizione
 - Nutrigenomica per verificare le “affinità” con il cibo
 - Tossicogenomica per incrementare sicurezza e salubrità

I NOSTRI PROGETTI



ECOTOSSICOGENOMICA

TOSSICOGENOMICA

NUTRIGENOMICA

Schema delle fasi sperimentali

Campioni analizzati:

LAVAGNA

PORTO VENERE

BIANCO PROCEDURALE

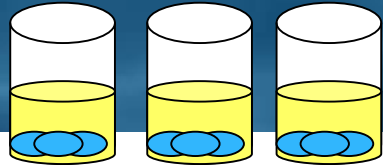
Estratti provenienti da pool di muscolo di branzino proveniente da **Lavagna**

Diluizione in DMSO

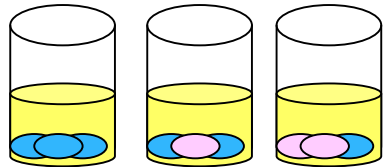
Test di vitalità dell'MTT su linea di carcinoma mammario T47D
(identificazione delle dosi da utilizzare negli esperimenti di microarray)

Esperimenti di microarray

TEST DI VITALITA' DELL'MTT



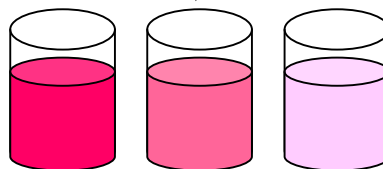
trattamento



incubazione con
MTT



solubilizzazione

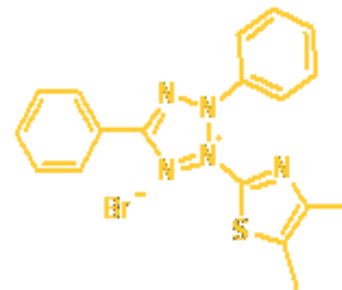


Letture a 540 nm

Semina in multiwell da 96 pozzetti

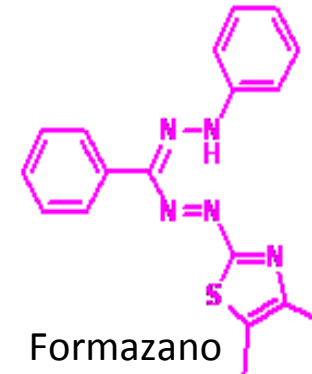
Bianco - Porto Venere -
Lavagna

72h e 6gg



Sale di tetrazolio (MTT)

Riduttasi



Formazano

Solo le cellule vitali sono in grado di ridurre a livello
mitocondriale, l'MTT in formazano

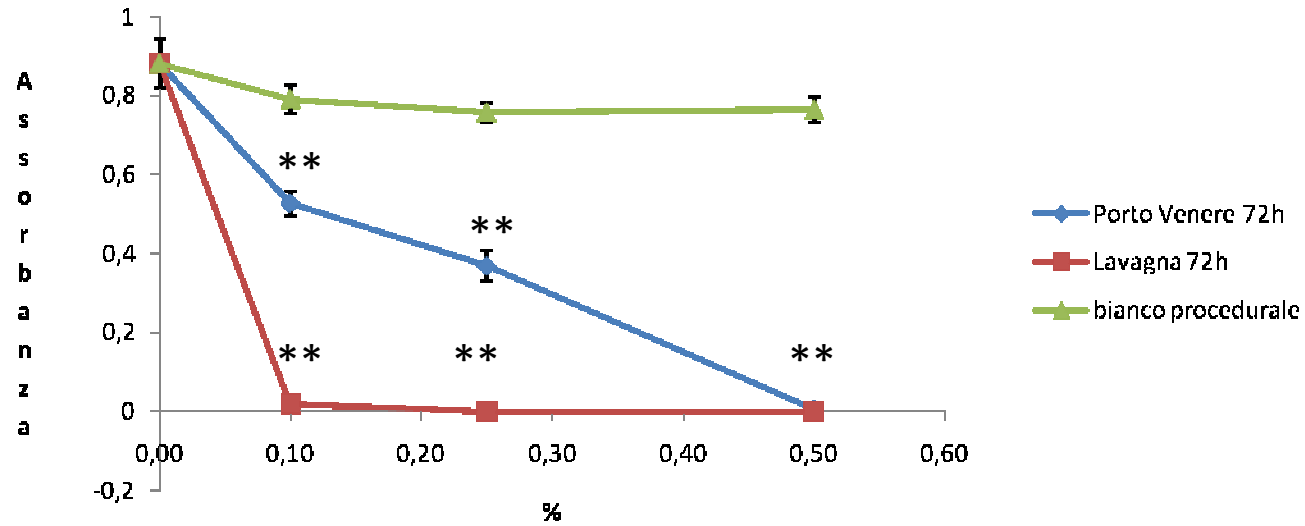
DOSI UTILIZZATE NEL TEST DELL'MTT

	% DMSO	pM	ppb
Porto venere	0.1%	0.19	0.64×10^{-4}
	0.25%	0.48	1.5×10^{-4}
	0.5%	0.95	3.0×10^{-4}
Lavagna	0.1%	0.13	0.4×10^{-4}
	0.25%	0.33	1×10^{-4}
	0.5%	0.65	2.1×10^{-4}

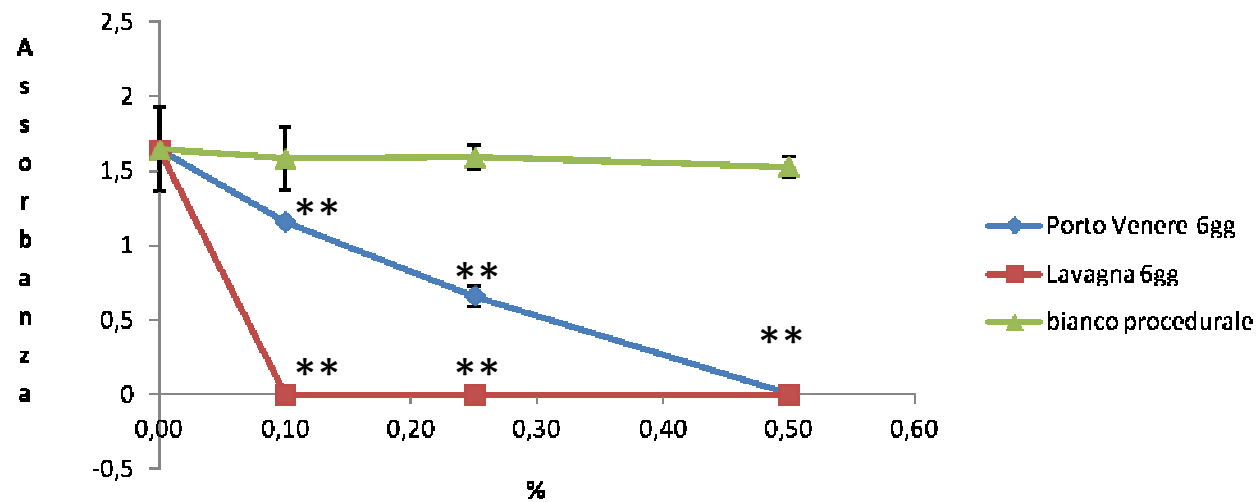
La dose espressa in %DMSO è quella riportata nei grafici successivi.
Questa modalità di espressione della dose consente di rappresentare in grafico anche il Bianco Procedurale

RISULTATI DEL TEST DELL'MTT

72h di trattamento



6 gg di trattamento

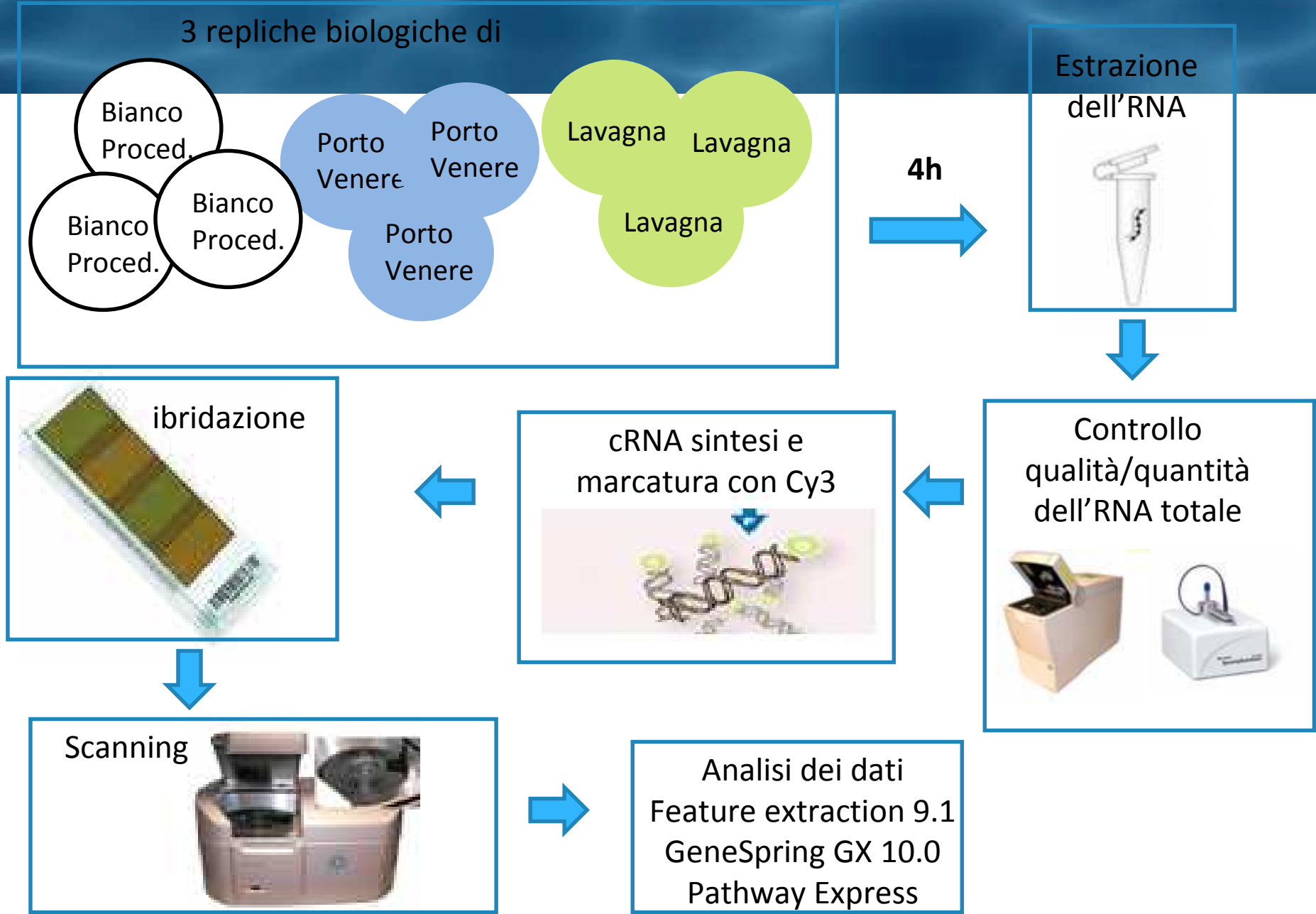


CALCOLO DELLA GI50

estratto	trattamento	Valori di GI 50	
		pM	ppb
Porto Venere	72h	0.18	5.76×10^{-5}
Lavagna		Non calcolabile	
Porto Venere	6gg	0.247	7.9×10^{-5}
Lavagna		Non calcolabile	

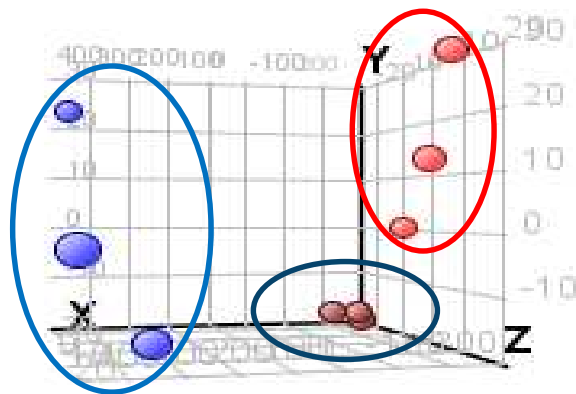
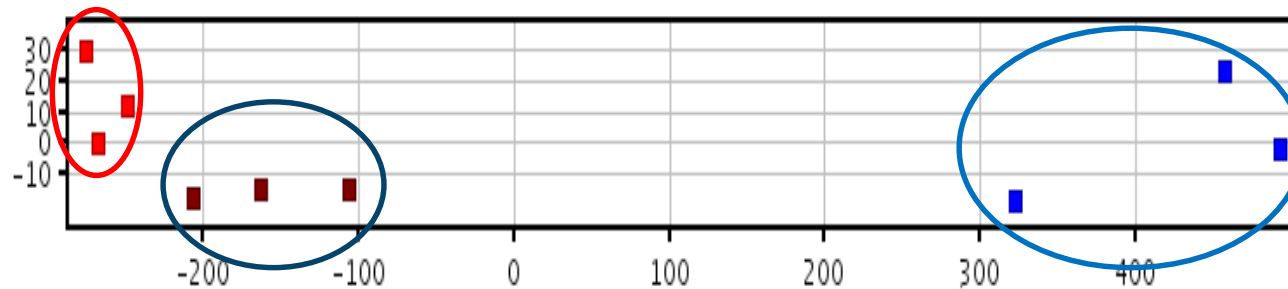
- Il Bianco Procedurale non mostra alcun effetto tossico evidente sulla linea cellulare esaminata
- Lavagna e Porto Venere presentano un effetto tossico statisticamente significativo (t-test di ogni dose rispetto al Bianco procedurale p-value < 0.01)
- L'estratto più contaminato da PCB e diossine (Porto Venere) presenta un effetto tossico di minore entità
- Le dosi di PCB e diossine rilevate nel muscolo di branzino così come quelle impiegate in vitalità sono al di sotto del limite massimo residuo di 8 pgTEQ/g peso fresco

Esperimenti di microarray



Analisi statistica dei dati di microarray : ANOVA

2982 geni differenzialmente espressi
p-value 0.05



- Bianco Procedurale
- Lavagna
- Porto Venere

I cluster ottenuti dalla PCA derivata dalla lista dei geni differenzialmente espressi, individuano esattamente i 3 trattamenti

Analisi statistica dei dati di microarray : T-test

Lavagna

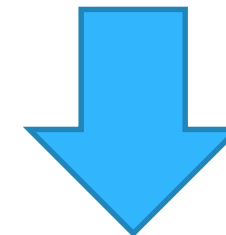
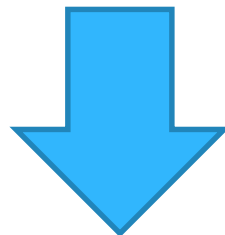
vs

Bianco
Proced.

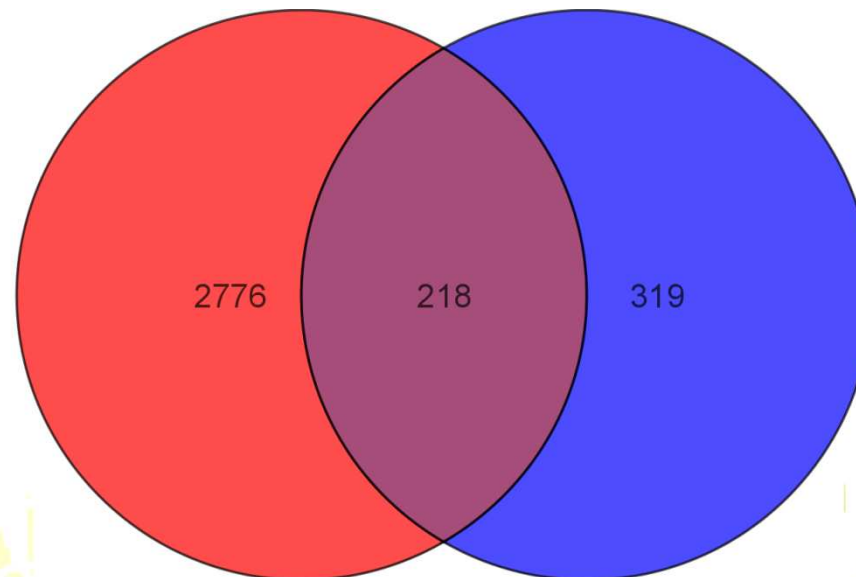
Porto
Venere

vs

Bianco
Proced.



2994 geni
p-value 0.05



537 geni
P-value 0.05

Quindi dai dati di microarray emerge che...

- Porto Venere e Lavagna modulano 218 geni comuni che potrebbero risultare dei potenziali biomarcatori di effetto da PCB e diossine presenti nei pesci