

Effetti cellulari e molecolari indotti da particelle ultrafini



Annamaria Colacci
Eccellenza Cancerogenesi Ambientale
ARPA - ER

Polveri Ultrafini e Nanoparticelle
Ferrara, 14 Novembre 2006

Overview

- ◆ Le particelle ultrafini inducono tumori?
- ◆ Quali sono i bersagli cellulari e molecolari della loro azione?
- ◆ Di quali strumenti investigativi disponiamo?

Di quali informazioni abbiamo bisogno per valutare i rischi per la salute?

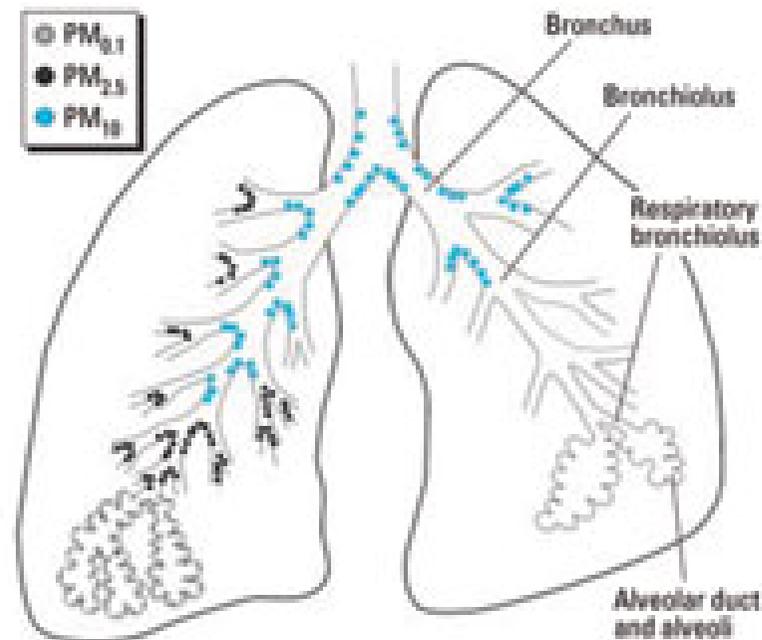
- ◆ Strumenti per valutare i rischi per la salute
 - ◆ Epidemiologia ambientale
 - ◆ Monitoraggio ambientale
 - ◆ Risk assessment
 - ◆ Biomarcatori

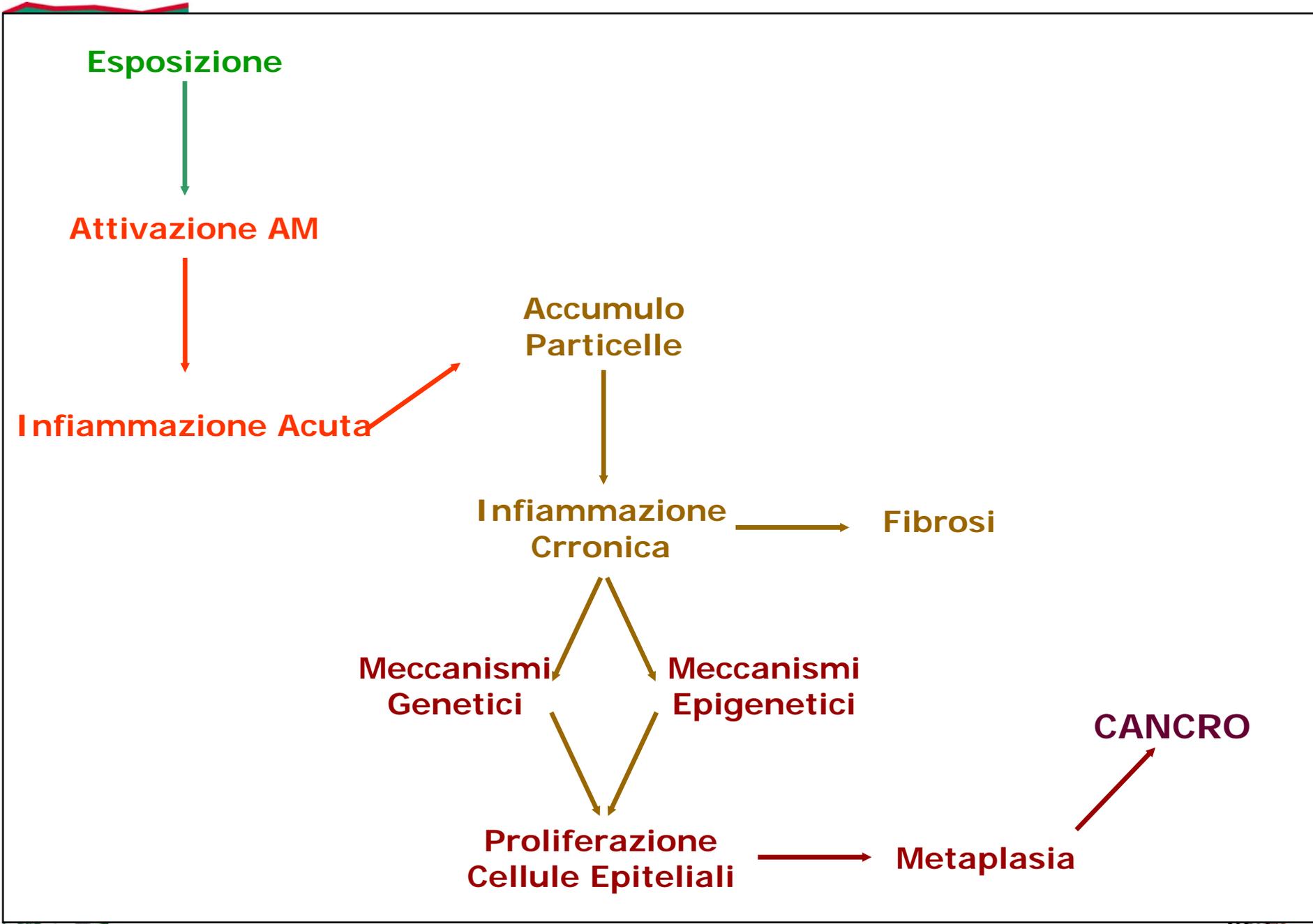
Particelle ultrafini e effetti sulla salute: che cosa sappiamo

- ◆ Gli studi epidemiologici hanno dimostrato che il PM nell'ambiente è associato a malattie respiratorie e patologie cardiovascolari
- ◆ Un'associazione molto forte è stata descritta con i decessi per complicazioni respiratorie e cardiovascolari, specialmente negli anziani
- ◆ Lo stress ossidativo, indotto dalle particelle inalate e che determina l'attivazione di geni del processo infiammatorio, potrebbe essere il meccanismo alla base degli effetti osservati
- ◆ Le particelle ultrafini (UFP) (diametro < 100 nm) sono considerate ampiamente responsabili per questi effetti
- ◆ Studi sull'animale indicano che a elevati livelli di esposizione a UFP e nanoparticelle di diossido di titanio hanno un potenziale tossico di gran lunga superiore a quello delle particelle con diametro $0.1-1.0$ μm

Le particelle ultrafini inducono tumore?

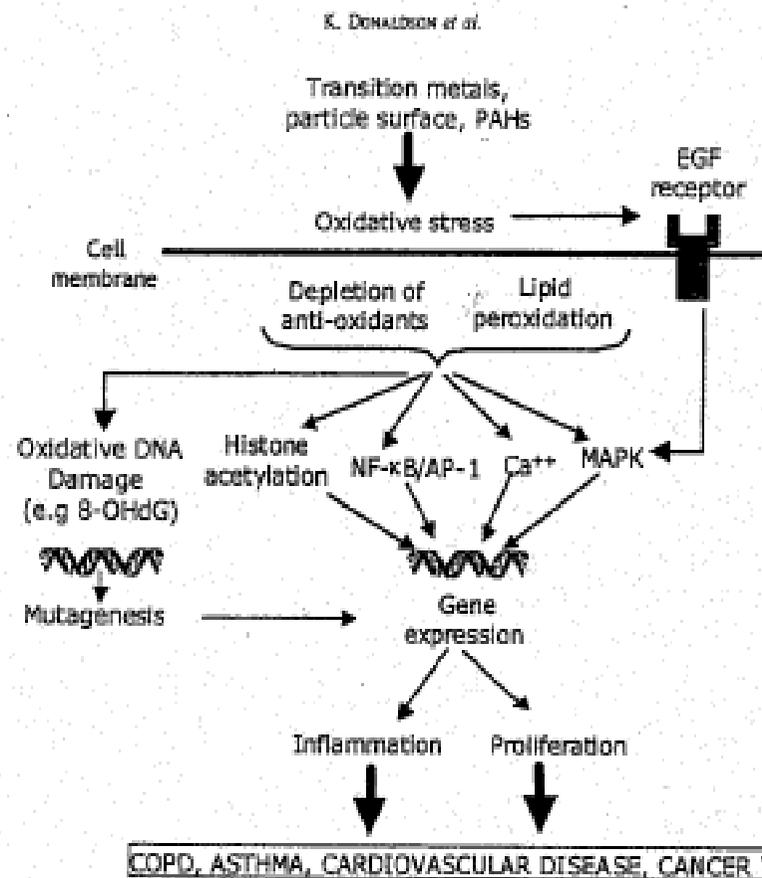
- ◆ Per le loro ridotte dimensioni le UFP sono in grado di penetrare la barriera alveolare e traslocare dal polmone a distretti extrapolmonari
- ◆
- ◆ Il polmone potrebbe essere il primo e primario bersaglio ma altri organi distali potrebbero essere colpiti





Qual è il ruolo delle particelle ultrafini a livello cellulare e d'organo?

- ◆ Radicali liberi persistenti sono presenti nella combustione generata da PM fini e ultrafini
 - ◆ Semichinoni
 - ◆ Inducono danno al DNA
 - ◆ Il danno è eliminato da SOD, catalasi and desferoxantina
- ◆ Le specie ossigeno reattive (ROS) sono coinvolte nella citotossicità indotta dalle emissioni diesel (DEP) e da PM urbano



Risom et al. Mutat. Res. 592: 119, 2005

Evidenze sperimentali 1

- ◆ Standard Reference Materials
 - EHC93
 - Aria Urbana da Ottawa
 - SRM1650
 - PM raccolto da un motore diesel
 - Sostituito da SRM2975, raccolto da un impianto industriale alimentato a diesel
 - SRM1649a
 - PM raccolto in un periodo di 12 mesi nei centri urbani di St. Louis e Washington
- ◆ DEP Japanese preparation

Evidenze sperimentali 2

- ◆ Modelli in vitro
 - ◆ A549 cellule epiteliali di polmone
 - ◆ Fibroblasti
 - ◆ Leucociti isolati
 - ◆ HepG2
 - ◆ Caco2
- ◆ Risultati
 - ◆ Danno al DNA in tutte le linee cellulari
 - ◆ Non è richiesta attivazione metabolica
 - ◆ Effetti alle dosi più basse testate

Evidenze sperimentali 3

- ◆ Modelli in vivo
 - ◆ Studi nei roditori
 - Esposizione a DEP
- ◆ Risultati
 - ◆ Incremento tumori del polmone correlati alla dose
 - ◆ Incremento dei livelli di stress ossidativo

Evidenze sperimentali 4

- ◆ Le preparazioni standard sono rappresentative di situazioni reali?
 - ◆ Recentemente è stato eseguito uno studio comparativo tra SRM2975 and DEP
 - Le due preparazioni sono diverse in termini di attività mutagena e tossicità polmonare

Le miscele complesse ambientali sono diverse tra loro perché diversi sono l'origine e il destino ambientali

Biomonitoraggio

◆ Studio in Cotonou, Benin

- ◆ 4 gruppi di 30 soggetti
 - Residenti area rurale
 - Residenti area suburbana
 - Residenti in strade ad alto traffico
 - Tassisti

Avobge et al. Carcinogenesis 26: 513, 2005

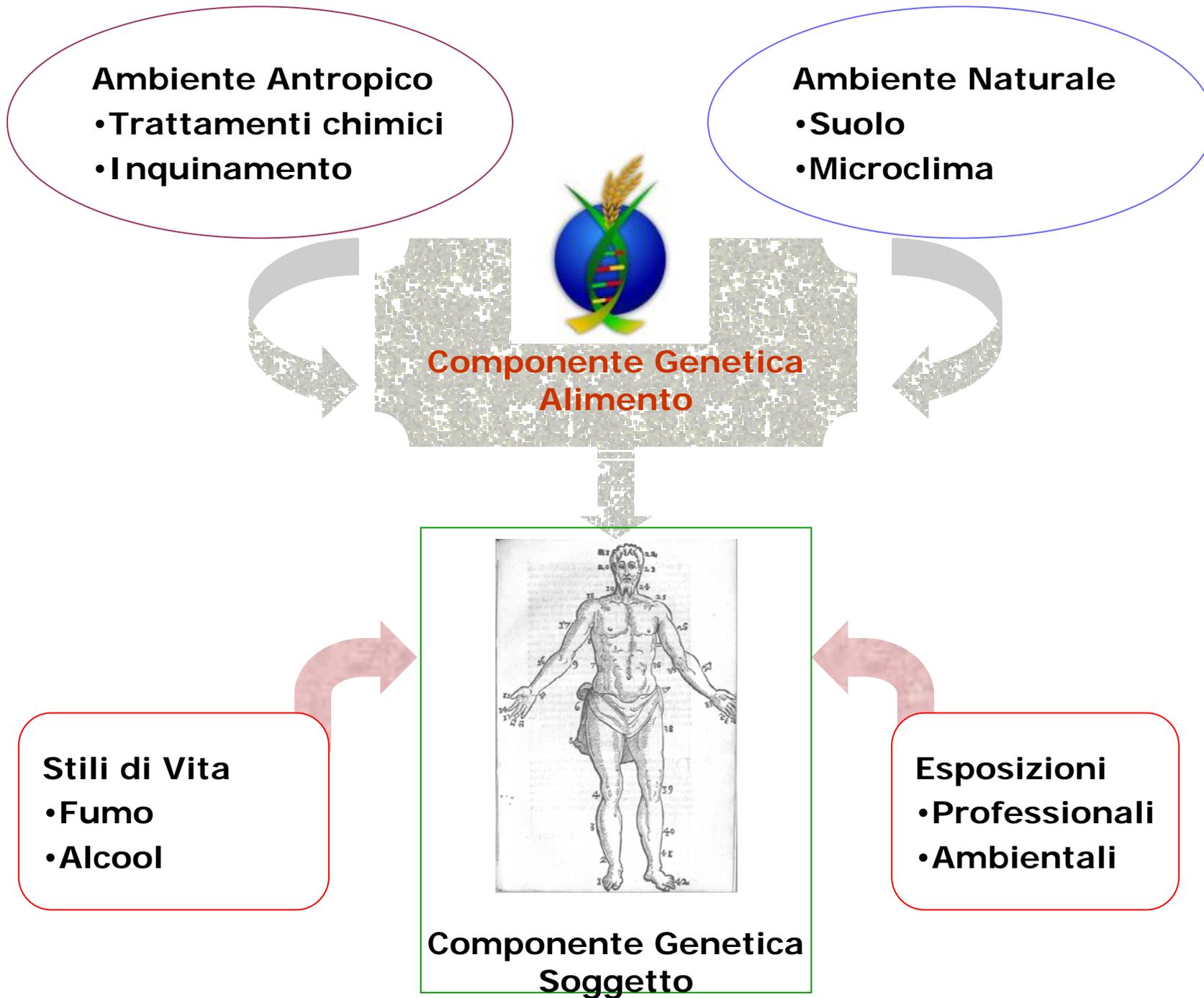
◆ Risultati

- ◆ Gradienti di esposizione in relazione alla concentrazione UFP
 - Motori a due tempi e carburante di scarsa qualità
- ◆ Danno correlato alla dose nei linfociti (SB)
- ◆ Danno anche alle dosi più basse

Questo approccio funziona solo ad alti livelli di esposizione. A livelli più bassi è necessario il monitoraggio individuale

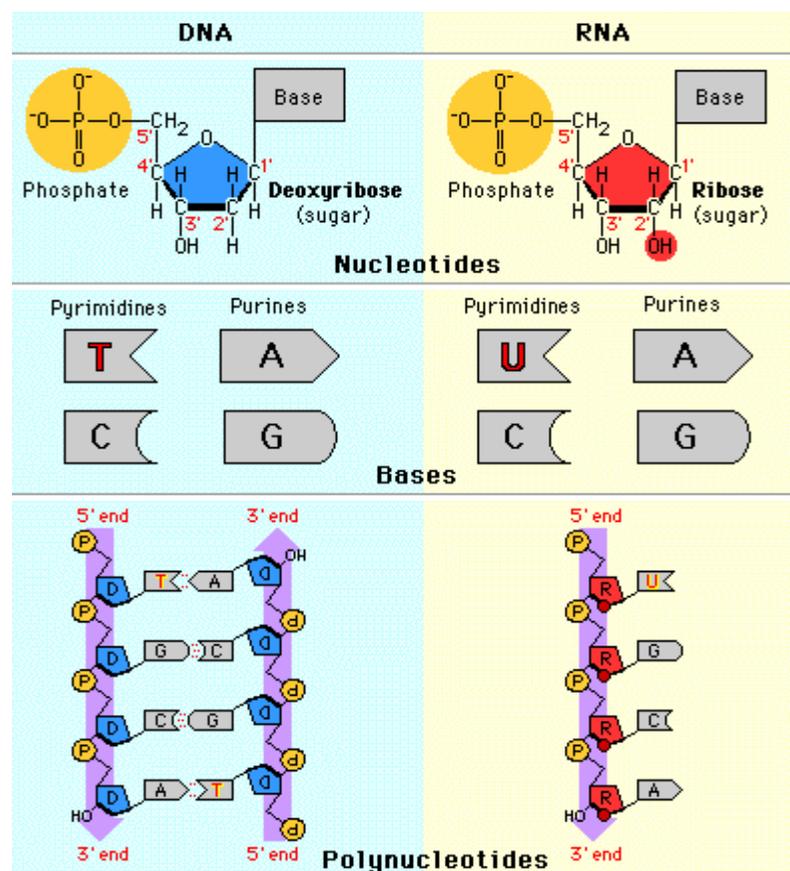
Un problema complesso richiede approcci complessi

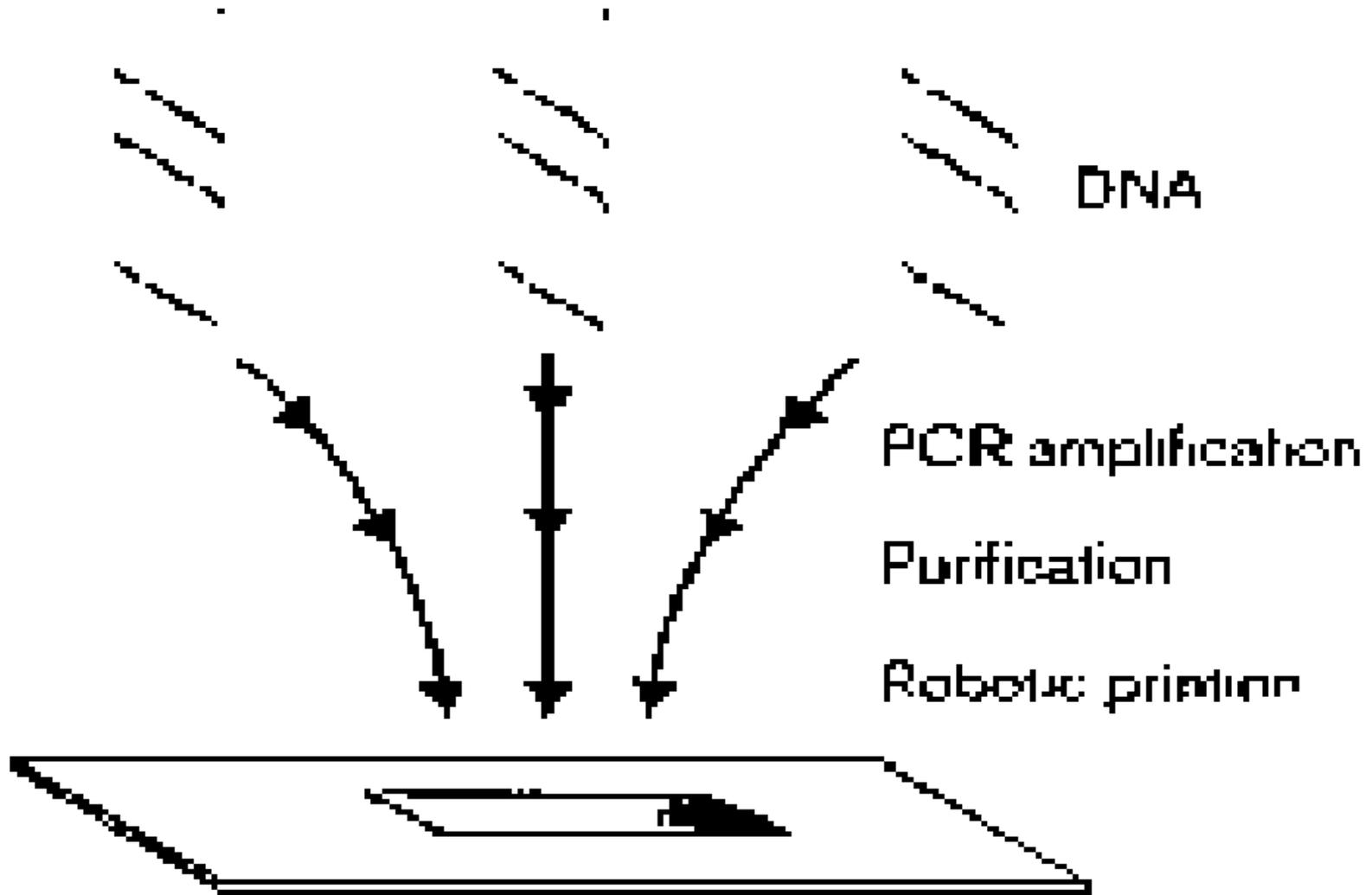
- ◆ PM, incluso UFP, sono miscele complesse associate ad altri fattori ambientali
- ◆ Sono diverse tra loro a seconda della sorgente, del contesto ambientale, della matrice in cui sono raccolte
- ◆ Gli effetti sono strettamente correlati con la dose
- ◆ La risposta può dipendere dalla suscettibilità genetica
- ◆ Tossicogenomica
 - ◆ Un approccio integrato per studiare le interazioni gene-ambiente
 - ◆ Fornisce una completa, specifica informazione degli effetti indotti dall'esposizione.
 - ◆ Può predire i rischi in base alla suscettibilità genetica

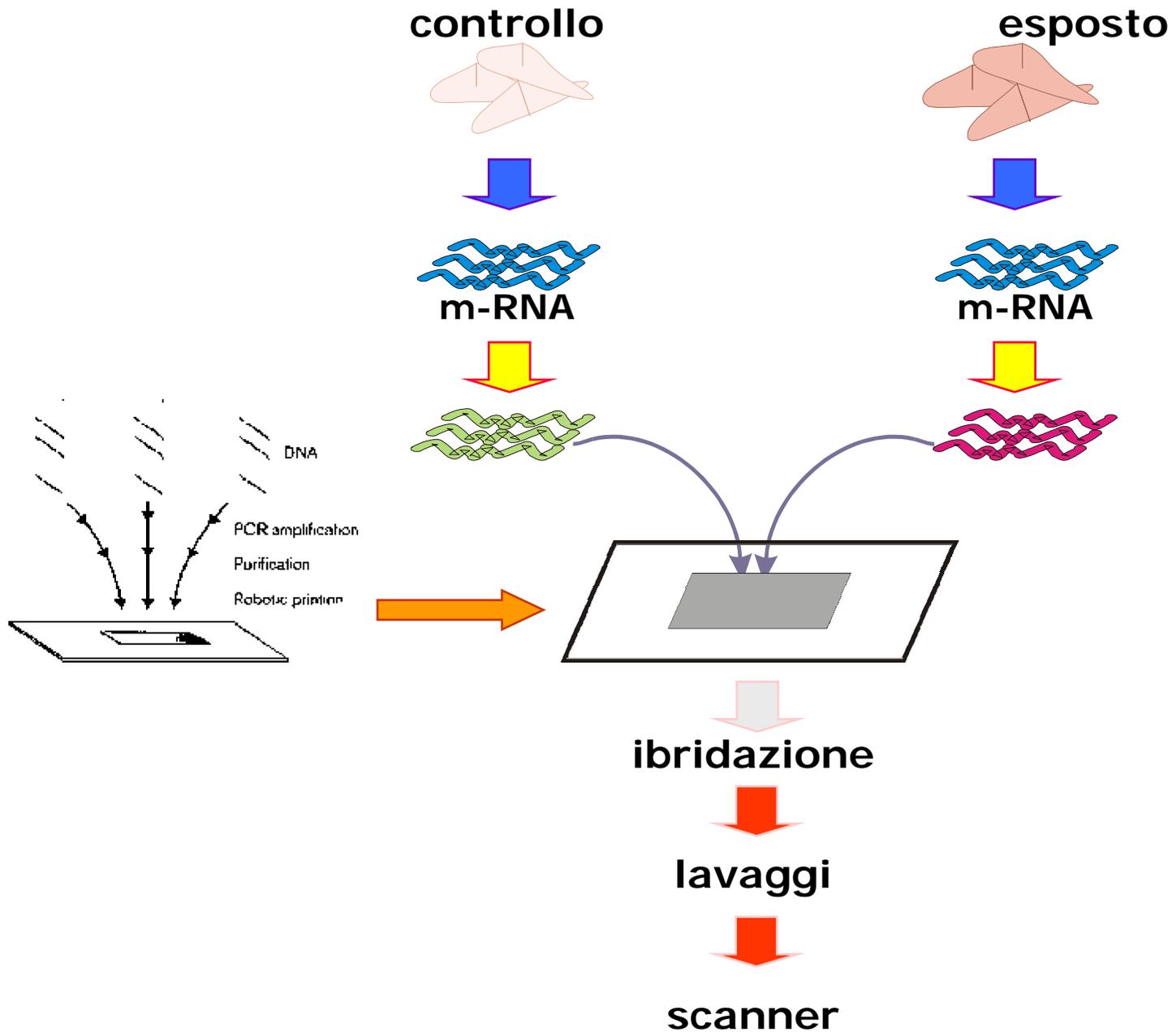


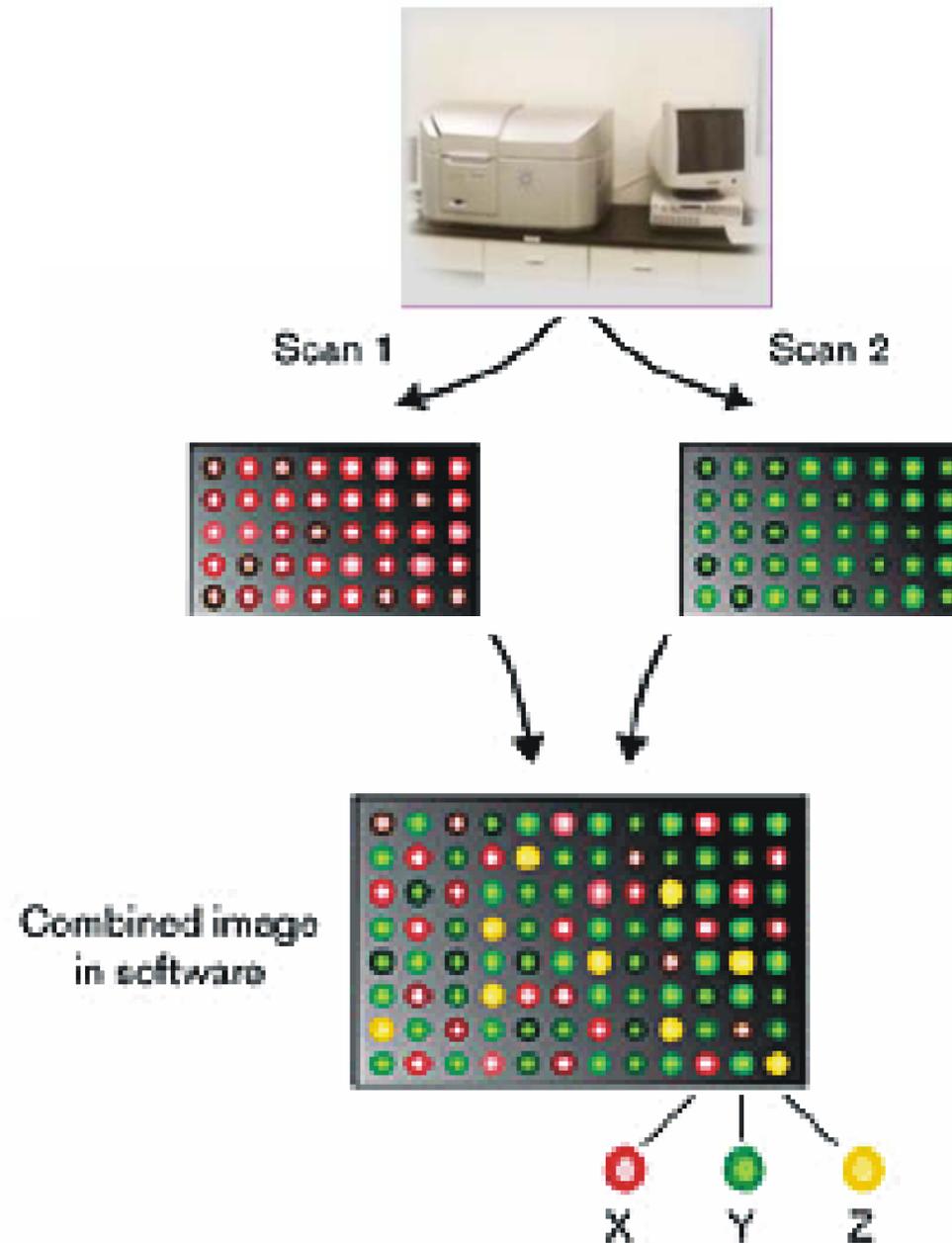
Tecnologie Biomiche: Genomica Funzionale

- ◆ Le tecnologie biomiche:
 - ◆ Metodologie di studio dell'era postgenomica
 - Genomica
 - Trascrittomica
 - Proteomica
 - Metabonimica
- ◆ La tecnologia microarray si basa sull'abilità di ogni acido nucleico a singolo filamento di accoppiarsi alla sequenza complementare









Bioinformatica e Data Mining

- ◆ **Feature Extractor**
 - ◆ Primo screening dei dati provenienti dallo scanner. Il software ha il compito di segnalare quegli spot troppo intensi, non uniformi
- ◆ **Normalizzazione**
 - ◆ Rende confrontabili i campioni etichettati con Cy3 e Cy5 ed ibridati congiuntamente su un singolo microarray.
 - ◆ Elimina errori sistematici dovuti a:
 - diversa quantità di mRNA associata ad ogni marcatore
 - diversa efficienza di incorporazione dei due marcatori
 - diversa intensità di radiazione emessa dai due marcatori differentemente misurata dal tubo fotomoltiplicatore
 - differenti intensità misurate in diverse parti del microarray a causa del posizionamento non perfettamente orizzontale del microarray rispetto al laser dello scanner
 - differenze tra gruppi di spot creati da differenti penne
- ◆ **Controllo qualità della *slide***
- ◆ **Analisi statistica dei dati**
 - ◆ Maanova di R
 - ◆ LIMMA
- ◆ **Interpretazione biologica:**
 - ◆ **GoMINER High-Throughput**
 - Integra i risultati di molteplici microarray in una singola analisi
 - Organizza la lista di geni modulati nel contesto di Gene Ontology un *database* che contiene una classificazione dei geni in categorie gerarchiche basate su processo biologico, funzione molecolare e compartimento cellulare

Tossicogenomica: la validità dell'approccio

- ◆ L'espressione genica è influenzata direttamente o indirettamente dall'esposizione ambientale
- ◆ L'espressione di alcuni geni è essenziale per lo sviluppo della malattia
- ◆ Le variazioni dell'espressione genica sembrano correlare con maggiore sensibilità e specificità all'esposizione di altri endpoint patologici
- ◆ I profili genici relativi a una specifica esposizione) possono essere usati come:
 - ◆ Biomarcatori di esposizione
 - ◆ Biomarcatori di rischio
 - ◆ Biomarcatori di stadio preclinico

VARIAZIONE GENE



FINGERPRINT



PREDIZIONE DEL RISCHIO

Profili genici in risposta all'esposizione ad aria

- ◆ Studi in vitro
 - ◆ MCF7 cells
 - Pattern di espressione genica
 - SRM1649a
 - Da solo
 - con benzo[a]pyrene (BP)
 - con dibenzo[a,l]pyrene (DBP)
- ◆ Risultati
 - ◆ alterazioni di 41 trascritti RNA in SRM
 - ◆ Aumento dell'espressione del citocromo P450 (CYP) in risposta a BP
 - ◆ Induzione additiva di CYP1A1 e CYP1B1 con il co-trattamento con SRM 1649a e BP.
 - ◆ Nessuna variazione nell'espressione di geni di CYP1A1 and CYP1B1 nella esposizione a DBP

Profili genici da esposizione a fonti diverse di inquinamento

◆ Studi in vivo

- ◆ Seoul e Ansan, Corea del Sud
 - Microarray a c-DNA (1152 geni)
 - 54 lavoratori addetti alla ispezione dei veicoli
 - 31 lavoratori di un impianto di incenerimento
 - 84 non esposti sani
 - Approcci addizionali
 - Micronucleo
 - Comet assay
 - Per valutare la correlazione tra l'espressione genica e un biomarcatore convalidato di rischio genotossico
 - Proteomica

◆ Risultati

- ◆ L'espressione genica era significativamente diversa nei due gruppi (esposti/non esposti)
- ◆ 11 geni iperespressi e 4 geni ipoespressi nei lavoratori dell'inceneritore
- ◆ 8 proteine iperespresse e 1 proteina ipoespressa in entrambe le categorie di lavoratori
- ◆ Geni e proteine dello stress ossidativo erano iperespressi in entrambe le categorie di lavoratori

Profili genici da esposizione ad aria

◆ Studi in vivo

◆ Teplice area - Repubblica Ceca

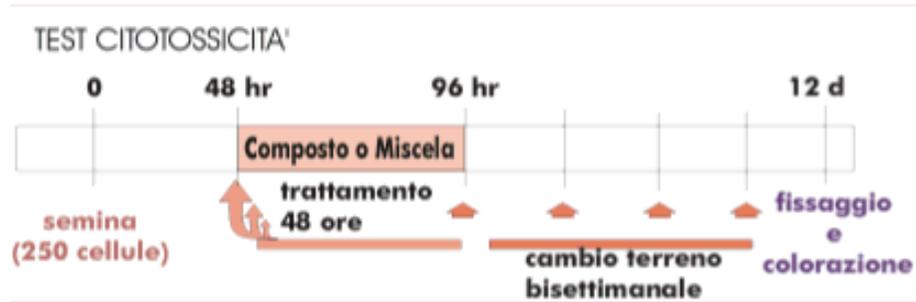
- distretto minerario con elevati livelli di inquinamento
- Microarray a oligonucleotidi (22K)
 - 23 bambini dall'area di Teplice
 - 24 bambini di un'area rurale di Prachatice
- Approccio addizionale
 - Le espressioni geniche individuali sono state correlate con le frequenze dei micronuclei nei linfociti periferici
 - Per valutare la correlazione tra l'espressione genica e un biomarcatore convalidato di rischio genotossico

◆ Risultati

- ◆ L'espressione genica era significativamente diversa nei due gruppi (esposti/non esposti)
- ◆ Un considerevole numero di geni correlava con le frequenze di micronuclei
- ◆ L'assemblaggio del nucleosoma (cromatina) è risultato il principale processo biologico influenzato dall'esposizione
- ◆ Questo suggerisce un effetto dell'inquinamento dell'aria sulla unità strutturale primaria del DNA

Tossicogenomica, PM fini e ultrafini e Cancro: cosa stiamo facendo

- ◆ Modello cellulare in vitro e tecnologia microarray
 - ◆ Valutare gli effetti citotossici delle particelle fini e ultrafini
 - ◆ Identificare le correlazioni dose-risposta
 - ◆ Predire l'effetto tumorale
 - ◆ Valutare il rischio cancerogeno
 - ◆ Individuare i profili genici in relazione alla qualità dell'aria



Tossicità

Endpoint misurato

Riduzione dell'efficienza clonale (numero colonie)

Razionale

Misura l'effetto tossico della miscela (effetto a breve termine)

Metodi

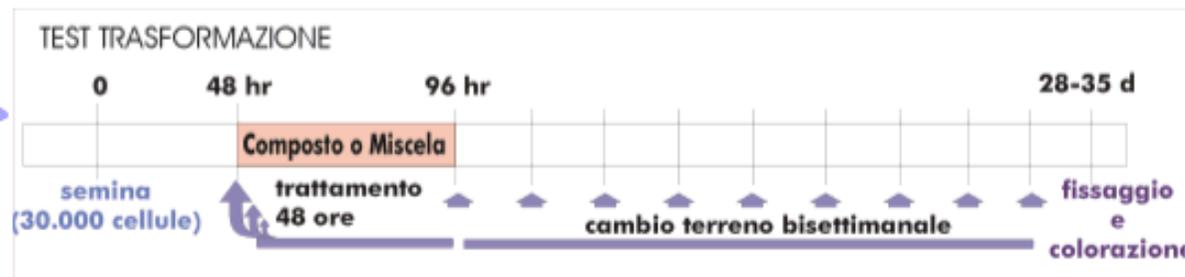
Trasformazione

Endpoint misurato

Incremento trasformazione (numero foci maligni)

Razionale

Misura la potenziale cancerogenicità della miscela (effetto a lungo termine)



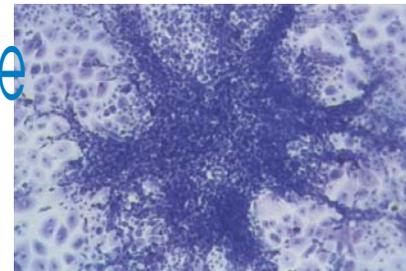
ARPA – Eccellenza Cancerogenesi Ambientale



endpoint = formazione foci

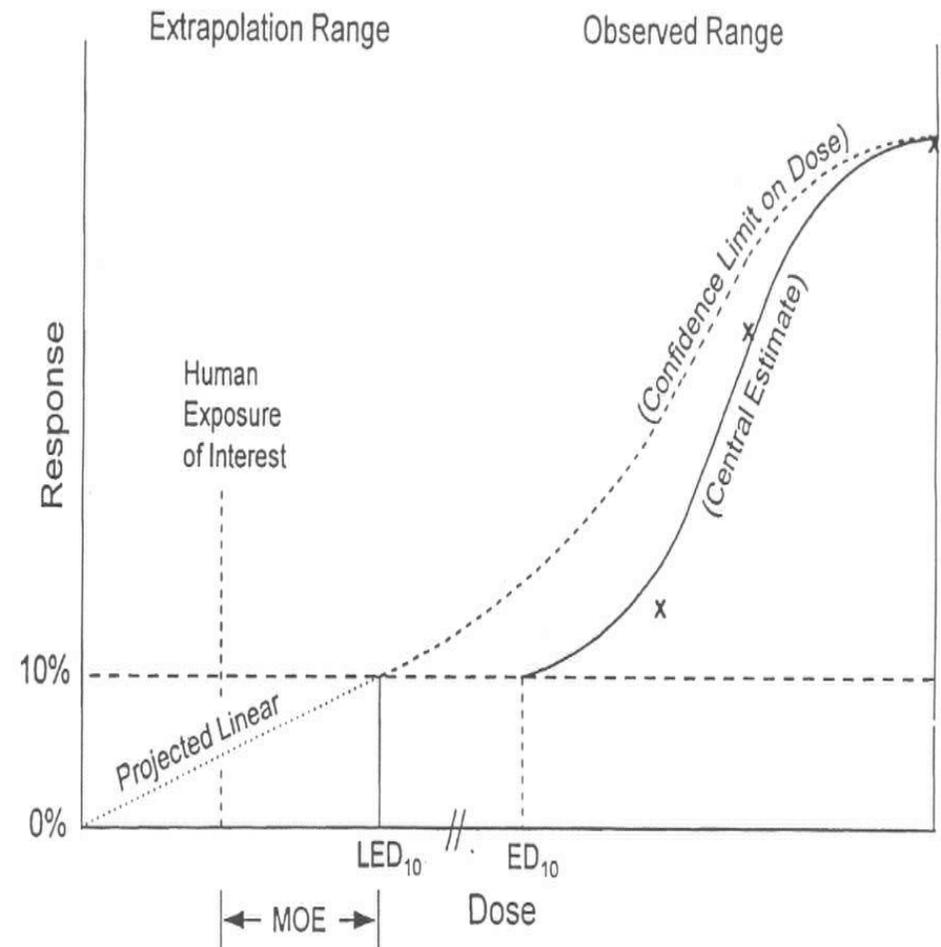
Endpoint finale = frequenza di trasformazione

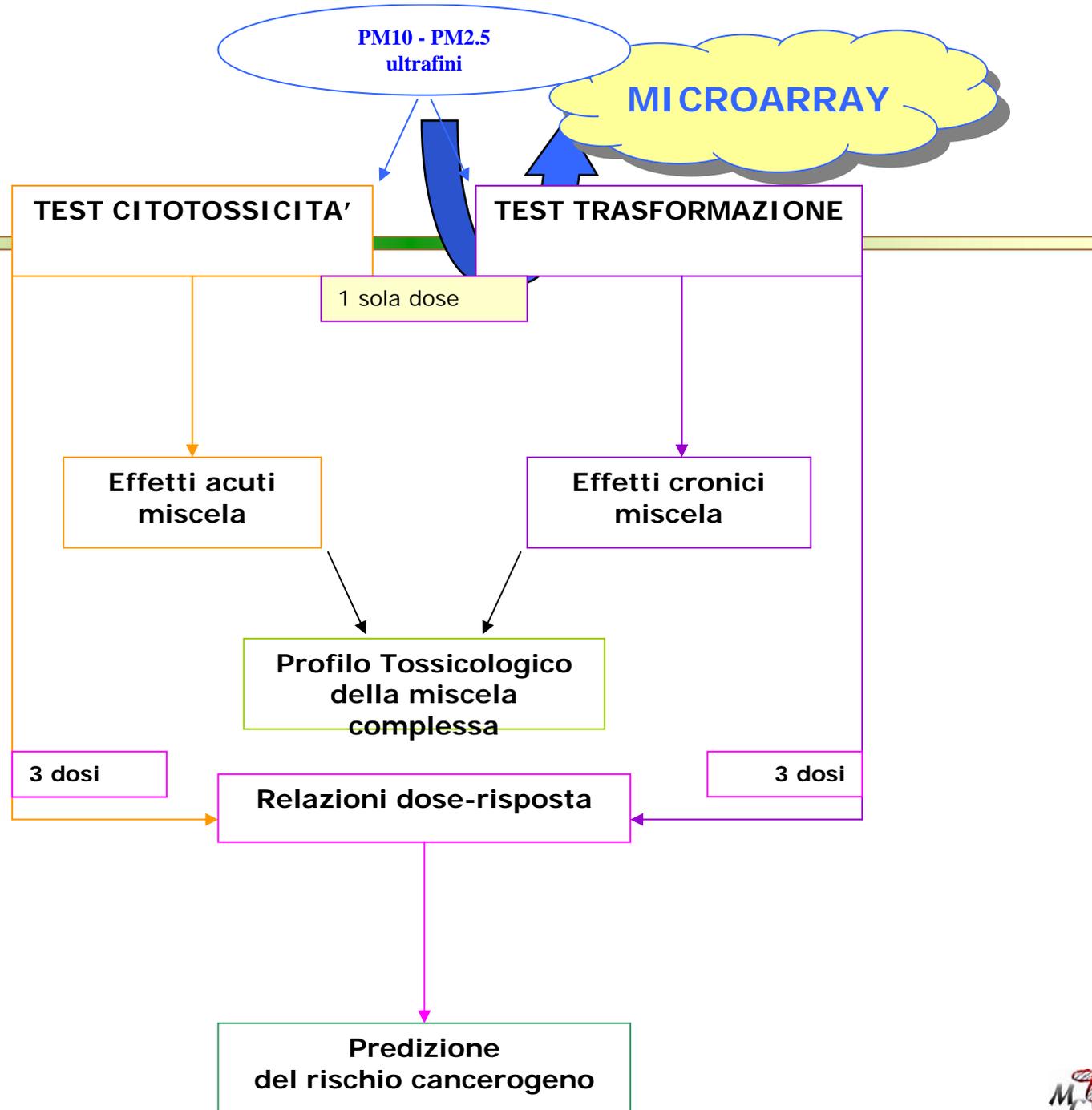
TF = numero foci/efficienza clonale

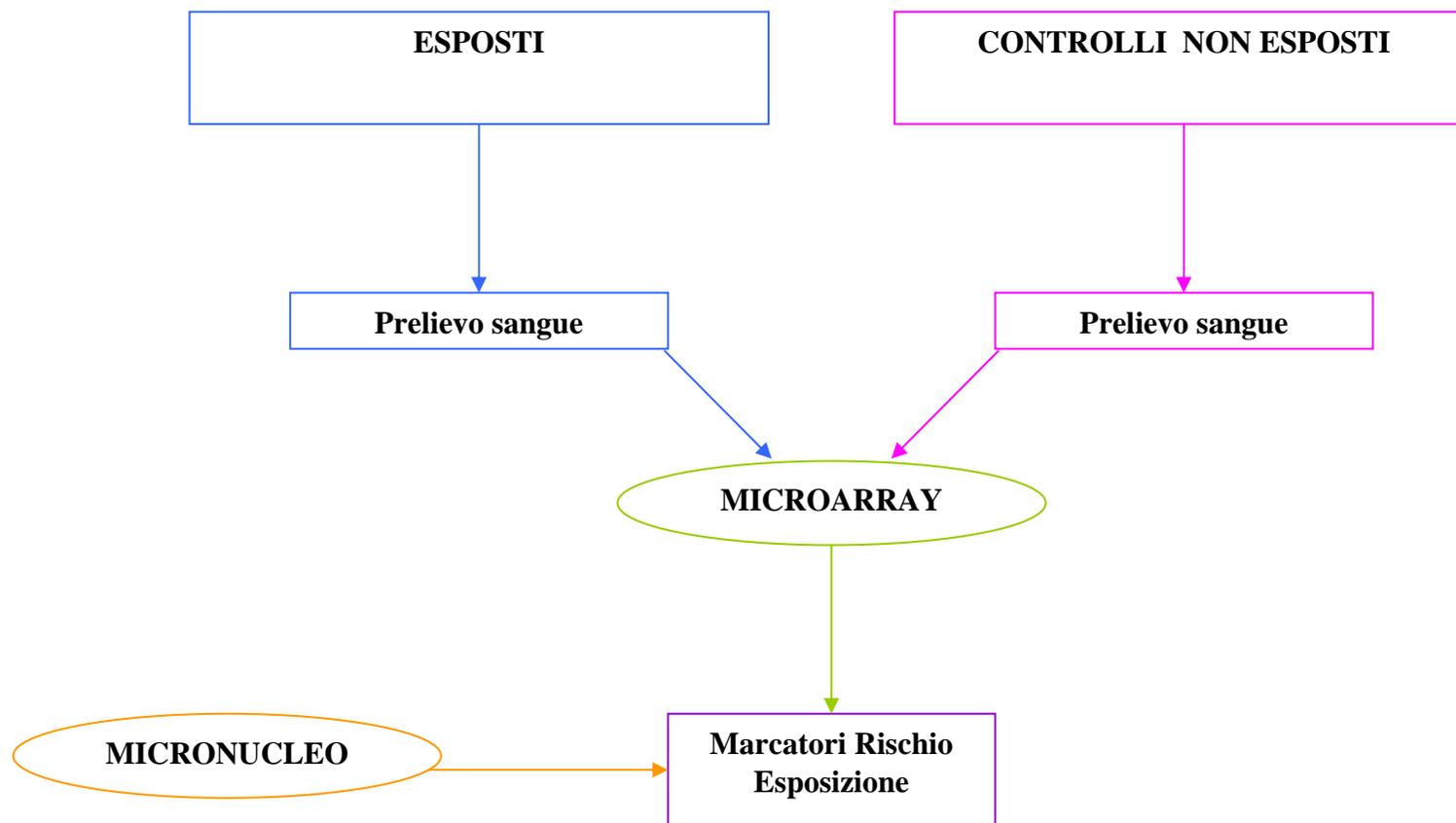


Slope factor e stima del rischio cancerogeno

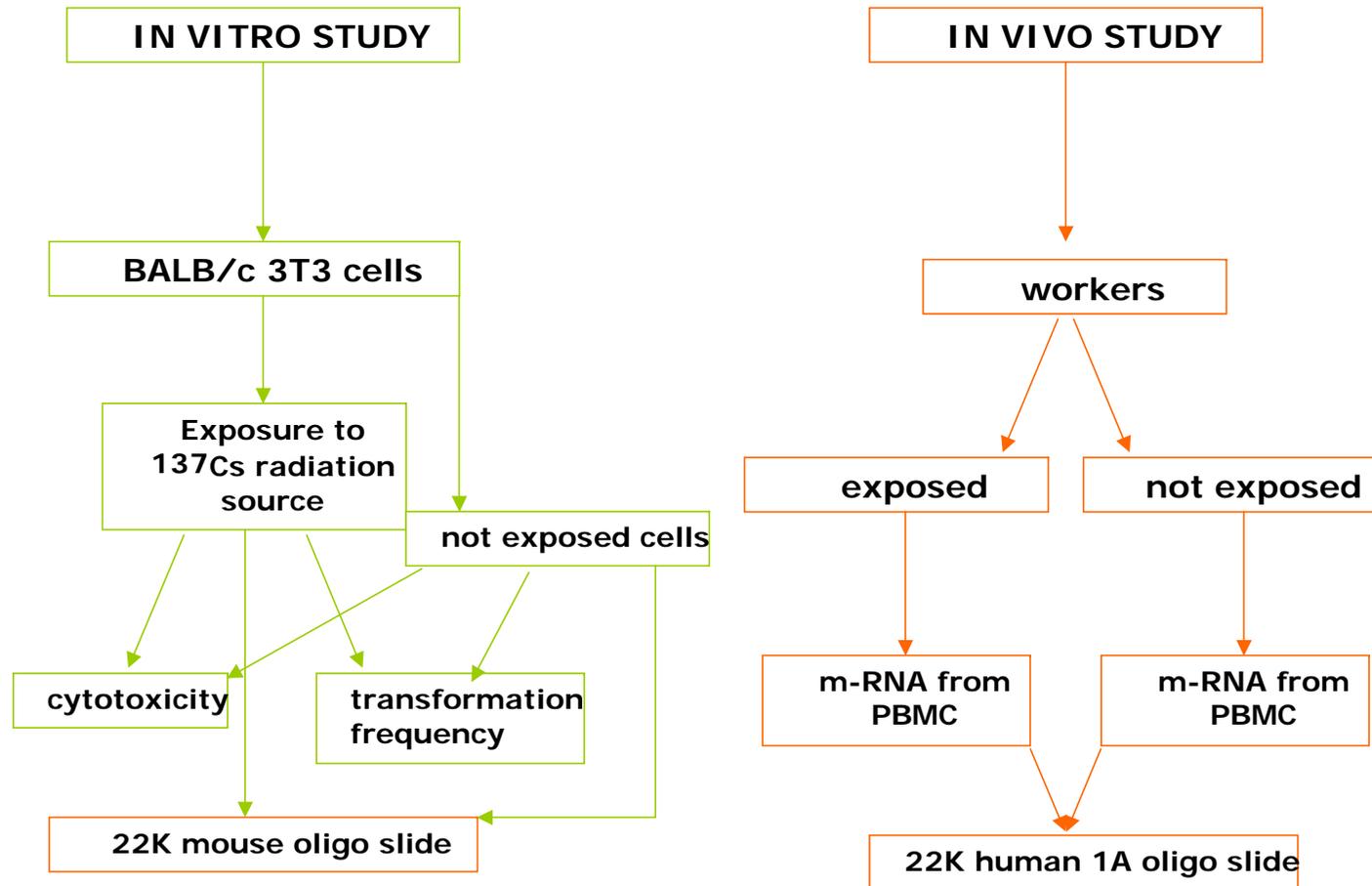
- ♦ La valutazione del rischio (Risk Assessment) comprende procedure di stima della probabilità che un effetto indesiderato possa essere generato da una esposizione
- ♦ Lo "slope factor" di potenza oncogena è l'incremento del rischio tumore in tutta l'aspettativa di vita per incremento dell'unità della dose di esposizione







The MARINER Project



Fingerprints

- ◆ 270 geni
differentemente
espressi fra le due
classi di esposti e non
esposti ($P < 0.01$)
- ◆ **GO:0031497**
 - ◆ chromatin_assembly
- ◆ **GO:0006334**
 - ◆ nucleosome_assembly

