

## IMPATTO DELL'ESPOSIZIONE PERINATALE AI PESTICIDI SULLA SALUTE DELL'ADULTO

### PROGETTO DI RICERCA

Obiettivo specifico di questo progetto è quello di valutare i meccanismi epigenetici che mediano gli effetti dell'esposizione perinatale ai pesticidi sul fenotipo ipnico dell'adulto. I pesticidi sono ampiamente utilizzati in agricoltura, case e giardini. I dati raccolti nell'ultimo decennio supportano la neurotossicità per lo sviluppo di insetticidi organofosfati e del più diffuso di loro, il Chlorpyrifos (CPF). L'esposizione al CPF si verifica principalmente attraverso l'assunzione di alimenti in adulti e bambini. Il CPF è un potente inibitore dell'acetilcolinesterasi ed in sua presenza si avranno livelli eccessivi di neurotrasmettitore nelle sinapsi colinergiche. L'iperattivazione colinergica, prodotta nei ratti in periodo perinatale mediante l'esposizione alla nicotina, induce crescita intrauterina ritardata, sovra-esposizione ai glucocorticoidi materni, alterazione dei recettori ippocampali per i glucocorticoidi (GR) e della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Gli stessi meccanismi, indotti dall'iperattivazione colinergica, vengono presumibilmente attivati anche negli animali esposti nel periodo perinatale al CPF. È probabile che le interazioni epigenetiche gene-ambiente rappresentino il collegamento mancante tra gli eventi della prima infanzia e il fenotipo dell'adulto. La relazione tra gli eventi delle prime fasi della vita e il fenotipo adulto è mediata da meccanismi epigenetici; in particolare, la metilazione del promotore dei glucocorticoidi è considerato il principale meccanismo epigenetico alla base della riprogrammazione dell'attività dell'asse HPA nell'adulto e della produzione di glucocorticoidi. I glucocorticoidi esercitano effetti centrali sul sonno, promuovendo la veglia, sulla neurogenesi, sul metabolismo e sul sistema cardiovascolare. Si vuole quindi testare l'ipotesi che l'esposizione perinatale al CPF possa, mediante meccanismi epigenetici, determinare nell'adulto un'alterazione del sonno, con insonnia e perdita dell'omeostasi del sonno ed aumento della suscettibilità allo sviluppo di apnee del sonno, che si associano a comorbidità cardiovascolari e metaboliche. Disordini del sonno quali l'insonnia rappresentano condizioni assai debilitanti e molto comuni, ad alto impatto economico e sociale. Il progetto prevede lo studio di topi maschi e femmine figli di madri esposte al CPF durante il periodo della gravidanza e dell'allattamento. Negli animali divenuti adulti verranno misurati i livelli plasmatici di glucocorticoidi per valutare la funzionalità dell'asse HPA e verrà ottenuta una caratterizzazione completa del fenotipo ipnico, con valutazione della

funzionalità cardiovascolare e respiratoria. Infine, in ogni animale, verrà valutato il pattern epigenetico dei geni coinvolti nella riprogrammazione dell'attività dell'asse HPA.

Scopo del progetto è valutare la programmazione epigenetica del fenotipo ipnico dell'adulto in seguito all'esposizione perinatale al CPF. I processi epigenetici sono attivi nel cervello e sono stati collegati a un numero crescente di disturbi neurologici tra cui i disturbi del sonno [1]. Lo studio dell'interazione epigenetica gene-ambiente è un campo di ricerca emergente ed i risultati ottenuti fino ad ora sono frammentari. In particolare, manca ancora una valutazione degli effetti epigenetici dell'esposizione al CPF sul fenotipo ipnico negli adulti. La comprensione della patogenesi dei disordini ipnici degli adulti è un problema importante, a causa dell'elevata prevalenza dei disturbi del sonno e dell'impatto dei disturbi del sonno sulla morbilità cardiorespiratoria e metabolica. La delucidazione del legame epigenetico tra l'esposizione perinatale al CPF e le alterazioni ipniche dell'adulto potrebbe aprire un nuovo campo di ricerca per i trattamenti epigenetici dei disturbi del sonno, debellando i disturbi ipnici con trattamenti farmacologici. Verrà verificata l'ipotesi che l'esposizione perinatale al CPF causi un aumento dell'esposizione ai glucocorticoidi durante il periodo perinatale, riprogrammando così l'asse HPA. È probabile che una modificazione epigenetica del gene del recettore dei glucocorticoidi (GR) dell'ippocampo sia responsabile dell'alterazione dell'asse HPA che porta a livelli elevati di glucocorticoidi nell'adulto [2], anche in risposta a fattori di stress lievi. I glucocorticoidi, a loro volta, influenzano il pattern di sonno, aumentando la veglia e diminuendo il sonno, attraverso l'ormone rilasciante la corticotropina (CRH) [3]. È presumibile che l'esposizione perinatale al CPF comporti disturbi del sonno, con una compromissione dell'omeostasi del sonno [4] e frammentazione del sonno [5]. Il corticosterone (CORT), che è il principale glucocorticoide nei topi, è coinvolto nella regolazione del ritmo circadiano endogeno dell'attività che controlla l'espressione dei geni Period (Per) 1 [6] e 2 [7]. Pertanto, è plausibile che l'esposizione perinatale al CPF influenzi sia il profilo di CORT nelle 24 ore, sia il ritmo circadiano endogeno di attività nei topi adulti. È anche possibile che i topi adulti sottoposti allo stress perinatale dell'esposizione al CPF abbiano una maggiore reattività alle condizioni di stress ambientale, secondo il modello di iperattività dell'insonnia umana [8]. I disturbi del sonno sono condizioni debilitanti che comportano un onere sociale ed economico importante [9]. Per quanto riguarda la regolazione sonno-dipendente, è possibile che anomalie

respiratorie già descritte in neonati stressati [10] possano persistere ed esacerbarsi durante l'età adulta, con una maggiore suscettibilità allo sviluppo di apnee del sonno. Questa scoperta sarebbe interessante, perché la sindrome da apnea del sonno è associata a comorbilità cardiovascolare e metabolica [11]. Ci si aspetta anche che si verifichino squilibri di pressione sanguigna (BP) poiché lo stress prenatale aumenta i livelli di arginina-vasopressina (AVP) [12]. In particolare, è ipotizzabile che l'esposizione perinatale al CPF causi una compromissione sonno-dipendente della regolazione della pressione sanguigna in età adulta, con un profilo alterato della pressione arteriosa nelle 24 ore ed uno smorzamento della diminuzione della pressione arteriosa che si osserva durante il sonno (profilo non dipping). Il profilo non dipping è un potente fattore di rischio per le malattie cardiovascolari [13].

### **PROCEDURE SPERIMENTALI**

Gli esperimenti verranno condotti su topi inbred (C57BL6/J), con una identità genetica superiore al 99%, consentendo così un controllo completo delle componenti genetiche del comportamento. Topi maschi e femmine saranno alloggiati in gabbie da riproduzione con ciclo luce / buio 12:12 (luce alle 8:00) e temperatura impostata a 25 °C e con libero accesso a cibo e acqua. Il CPF sarà sciolto in olio di arachidi (veicolo). Il CPF (6 mg / kg), o il suo veicolo sarà somministrato alle madri da 2 settimane prima dell'accoppiamento fino allo svezzamento mediante gavage. Tutti gli animali saranno pesati alla nascita e poi settimanalmente.

I pacchetti di lavoro (WP) saranno due.

WP 1 dosaggio dell'acetilcolinesterasi (AChE), profilo dei glucocorticoidi e fenotipo ipnico e cardiorespiratorio.

Dosaggio AChE. Per controllare gli effetti del CPF sui livelli sierici e cerebrali di AChE 2 topi per nidiata alla nascita saranno sacrificati mediante decapitazione e saranno immediatamente raccolti cervello e sangue, [14-15].

Gli effetti dell'esposizione perinatale al CPF saranno testati in topi adulti, esposti e di controllo, (8 maschi e 8 femmine, trattati e non trattati) a diverse età.

Profilo dei glucocorticoidi (14 settimane di età, 8 maschi e 8 femmine, trattati e non trattati). La disfunzione dell'HPA dell'adulto sarà valutata mediante quantificazione dei livelli di CORT e CRH, tramite saggi immunoenzimatici [16-21].

Sonno e fenotipo cardiorespiratorio (20 settimane di età). Gli stessi topi (8 maschi e 8 femmine, trattati e non trattati) su cui si è valutato il profilo dei glucocorticoidi verranno impiantati con dispositivi per la registrazione simultanea di elettroencefalogramma (EEG), elettromiogramma (EMG), pressione arteriosa (PA). Dopo 2 settimane di recupero, i segnali di EEG, EMG, attività locomotoria, PA e attività ventilatoria verranno registrati in modo non invasivo in una camera pletismografica per 8 ore.

Il ciclo veglia-sonno e le regolazioni di PA dipendenti dal sonno saranno studiate in condizioni basali (48 ore di registrazioni continue) e quindi utilizzando un protocollo di deprivazione di sonno (SD, mediante gentle handling), di cage switch (CS, in cui il topo viene esposto alla segatura utilizzata da un altro animale) e di resident intruder (RI, introducendo nella gabbia del topo un altro animale). Questi protocolli rappresentano condizioni di stress di media entità e consentono di valutare l'omeostasi del sonno (ed esempio il recupero di sonno dopo SD), la tendenza a sviluppare insonnia psicogena (protocollo di CS) e le risposte autonome a situazioni stressanti (protocolli di SD, CS, RI) [22]. Veglia, sonno NREM e sonno REM saranno discriminati analizzando visivamente i tracciati EEG ed EMG con una risoluzione di 4 secondi. L'analisi dei dati verrà effettuata mediante software Labview, Matlab, e SPSS. Verrà valutata la macro e la microstruttura del sonno, e la potenza spettrale del sonno NREM. I valori battito-battito di PA e frequenza cardiaca verranno utilizzati per calcolare indici di modulazione autonoma simpatica e parasimpatica già validati nel topo [23]. L'analisi dell'attività ventilatoria consentirà la determinazione di volume corrente, periodo respiratorio, ventilazione minuto; verranno quantificate le apnee respiratorie ed i sospiri in sonno NREM e in sonno REM [24]. Dopo il protocollo RI verranno raccolti campioni ematici per la valutazione dei livelli di arginina vasopressina e CORT.

WP2 analisi epigenetiche. Al termine delle procedure sperimentali i topi in anestesia generale verranno perfusi per via transcardiaca con paraformaldeide al 4%, i cervelli verranno rimossi per la valutazione dello stato di metilazione dei geni per GR, AVP e CRH.

## **Bibliografia**

1. Lucassen, P.J., et al., Trends Neurosci, 2013. 36(11): p. 621-31.
2. Weaver, I.C., et al., Nat Neurosci, 2004. 7(8): p. 847-54.
3. Chang, F.C., et al., Neurosci Biobehav Rev, 2001. 25(5): p. 445-53.
4. Shimizu, N., et al., PLoS One, 2013. 8(5): p. e64263.
5. Dugovic, C., et al., J Neurosci, 1999. 19(19): p. 8656-64.
6. Yamamoto, T., et al., J Biol Chem, 2005. 280(51): p. 42036-43.
7. So, A.Y., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(41): p. 17582-7.
8. Palagini, L., et al., Sleep Med Rev, 2014. 18(3): p. 225-35.
9. Daley, M., et al., Sleep, 2009. 32(1): p. 55-64.
10. Cohen, G., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(10): p. 3817-21.
11. Floras, J.S., J Cardiol, 2014. 63(1): p. 3-8.
12. Murgatroyd, C., et al., Nat Neurosci, 2009. 12(12): p. 1559-66.
13. Hermida, R.C., Chronobiol Int, 2007. 24(4): p. 749-75.
14. Elluman, G.L., et al., Biochem Pharmacol, 1961. 7: p. 88-95.
15. Lowry, O.H., et al., J Biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-75.
16. Liu, L., et al., Toxicol Lett, 2012. 214(3): p. 307-13.
17. Rodgers, A.B., et al., J Neurosci, 2013. 33(21): p. 9003-12.
18. Weinstock, M., Neurosci Biobehav Rev, 2008. 32(6): p. 1073-86.
19. Nunez, H., et al., Neurosci Lett, 2008. 448(1): p. 115-9.
20. Chen, J., et al., J Neuroendocrinol, 2012. 24(7): p. 1055-64.
21. Matthews, P.A., et al., J Physiol, 2011. 589(Pt 16): p. 3969-81.
22. Bastianini, S., et al., Sleep, 2011. 34(2): p. 213-8.
23. Silvani, A., et al., Sleep, 2010. 33(3): p. 355-61.
24. Silvani, A., et al., PLoS One, 2014. 9(6): p. e100536.

### **PIANO DI ATTIVITA' DELL'ASSEGNISTA**

Il titolare dell'assegno collaborerà alle seguenti attività: gestione della colonia murina; somministrazione del CPF; attività microchirurgica di impianto di elettrodi; attività di registrazione di variabili fisiologiche in topi liberi di muoversi; utilizzazione del pletismografo per la valutazione dell'attività ventilatoria e la discriminazione degli stati di veglia, sonno non-REM e sonno REM in base all'analisi dei tracciati; analisi epigenetiche, immunoistochimiche, immunoenzimatiche; analisi matematica e statistica ed interpretazione dei risultati ottenuti.

Il presente progetto di ricerca si avvale di tecniche già messe a punto nei laboratori del tutor e dei suoi collaboratori, come dimostrato dalle pubblicazioni citate. Ci si attende quindi che durante il periodo dell'assegno di ricerca, il titolare completi gli esperimenti di caratterizzazione del fenotipo cardio respiratorio durante il sonno di topi C57B6J maschi e femmine trattati con CPF o con veicolo e le analisi epigenetiche.

Il nostro laboratorio è in grado di fornire al titolare dell'assegno una formazione completa e personalizzata, con una parte teorica comprendente nozioni di fisiopatologia respiratoria, fisiologia del ciclo veglia-sonno, nozioni di biologia molecolare, immunoistochimica, microchirurgia. Il progetto prevede un piano di formazione scientifica mirato a fornire gli strumenti di carattere teorico e pratico, necessari per il raggiungimento degli obiettivi del progetto.

Dal punto di vista pratico, il titolare dell'assegno di ricerca acquisirà le seguenti metodologie sperimentali:

- Mantenimento di colonie di topi
- Somministrazione di sostanze mediante gavage
- Manipolazione di animali e tecniche di iniezione sistemica
- Impianto chirurgico di elettrodi per la registrazione di segnali elettroencefalografico ed elettromiografico
- Perfusione trans-cardiaca e prelievo di tessuto cerebrale
- Tecniche immunoistochimiche ed immunoenzimatiche
- Tecniche per lo studio delle variabili respiratorie in camera pletismografica
- Impiego di test statistici di base per confronti multipli fra gruppi sperimentali.

Dal punto di vista teorico il progetto di formazione prevede:

- ◆ Frequenza a seminari tenuti nel Dipartimento presso il quale verrà svolto il piano di formazione. I seminari saranno tenuti sia da docenti del dipartimento sia da studiosi nazionali ed internazionali.
- ◆ Partecipazione a Congressi scientifici nazionali ed internazionali sul sonno e le neuroscienze (ad es., Società Italiana di Neuroscienze, Associazione Italiana di Medicina del Sonno, European Sleep Research Society, Federation of European Neuroscience Societies, Società Italiana di Fisiologia).
- ◆ Il titolare parteciperà inoltre a riunioni interne quotidiane con il tutor ed i membri dello staff del laboratorio per la programmazione dell'attività sperimentale e l'analisi dei risultati ottenuti. Sono previsti anche incontri mensili di approfondimento degli aspetti teorici del lavoro programmato. Al termine dell'attività il titolare terrà un seminario per l'esposizione dei risultati conseguiti.

Nell'ambito del progetto, saranno elementi caratterizzanti della formazione dell'assegnista l'acquisizione di autonomia nell'organizzazione ed esecuzione degli esperimenti e nella elaborazione ed interpretazione dei dati.