

## **PESTICIDI IN ETÀ PERINATALE E POSSIBILI RISCHI PER LA SALUTE DELL'ADULTO**

### **Progetto di ricerca**

È noto che fattori di stress perinatale possono predisporre all'insorgenza di patologie nell'adulto. Obiettivo specifico del progetto di ricerca è quello di valutare gli effetti dell'esposizione perinatale ai pesticidi sul fenotipo ipnico dell'adulto e sul rischio di sviluppare neuroinfiammazione e neurodegenerazione. I pesticidi sono ampiamente utilizzati in agricoltura, case e giardini. I dati raccolti nell'ultimo decennio supportano la neurotossicità di insetticidi organofosfati e del più diffuso tra essi, il Clorpirifos (CPF). L'esposizione a CPF si verifica principalmente attraverso l'assunzione di alimenti in adulti e bambini. Il CPF è un potente inibitore dell'acetilcolinesterasi (AChE), enzima di degradazione dell'acetilcolina, con conseguenti aumenti dei livelli di neurotrasmettitore a livello delle sinapsi colinergiche. Uno studio recentemente condotto dal laboratorio PRISM, ha dimostrato che l'esposizione in età perinatale alla nicotina (un potente attivatore colinergico) e ai suoi metaboliti è in grado di produrre alterazioni a lungo termine del sonno nel topo adulto, a causa di una riprogrammazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) associata ad una sotto-regolazione dei recettori dei glucocorticoidi (GR) e un'iperproduzione di glucocorticoidi (PMID: 34903845). Gli stessi meccanismi, indotti dall'iperattivazione colinergica, potrebbero quindi essere attivati anche negli animali esposti al CPF nel periodo perinatale. L'ipotesi secondo cui eventi a cui si viene esposti in età perinatale possano influenzare la salute dell'individuo adulto e predisporre allo sviluppo di alcune patologie come l'insonnia è intrigante ma non ancora supportata da solidi dati scientifici. Le interazioni epigenetiche gene-ambiente potrebbero rappresentare il legame mancante tra gli eventi della prima infanzia e il fenotipo adulto. L'ippocampo è particolarmente sensibile all'ambiente della prima infanzia perché si sviluppa principalmente dopo la nascita sia nell'uomo che nei roditori e ha anche un ruolo critico nella regolazione del feed-back negativo

dell'attività dell'asse HPA essendo la struttura cerebrale con la più alta concentrazione di GR (PMID: 23998452). Pertanto, la diminuzione della concentrazione di GR dell'ippocampo potrebbe essere responsabile della deregolazione dell'asse HPA con aumento dei livelli di glucocorticoidi e comparsa di disturbi del sonno. Oltre ai supposti effetti sul fenotipo ipnico, esperimenti preliminari eseguiti dal laboratorio PRISM hanno mostrato che l'esposizione perinatale al CPF determina aumenti della densità delle apnee durante il sonno, in particolare nelle figlie di madri esposte in età perinatale al CPF, dato in accordo con risultati ottenuti dopo esposizione cronica nel ratto (PMID: 29357379). Il progetto si propone, quindi, di verificare l'ipotesi che l'esposizione perinatale al CPF possa determinare nell'adulto un'alterazione del sonno con comparsa di insonnia, perdita dell'omeostasi del sonno ed aumento della suscettibilità allo sviluppo di apnee.

Studi condotti sia in vitro che in vivo (PMID: 26498265; 24376148) hanno inoltre evidenziato come l'esposizione a pesticidi sia in grado di determinare modificazioni cellulari e molecolari potenzialmente collegate allo sviluppo di malattie neurodegenerative, quali la malattia di Parkinson (PMID: 20589874; PMID: 16237164). In particolare, sono state osservate alterazioni dei processi di degradazione proteica operata dal proteasoma, un aumento dei livelli di  $\alpha$ -sinucleina nonché variazioni dell'espressione genica di alcuni neurotrasmettitori e recettori. Questi fenomeni si inseriscono nel più ampio scenario dei processi di neuroinfiammazione che sono stati recentemente associati a disturbi/privazione del sonno (PMID: 33642969, PMID: 32171783).

Sulla base di queste evidenze e visto il ruolo cruciale della neuroinfiammazione nelle patologie neurodegenerative (PMID:32674367), il secondo obiettivo del progetto sarà quello di valutare l'effetto a lungo termine dell'esposizione perinatale al CPF sui livelli di espressione delle citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e dei recettori attivati dai proliferatori perossisomiali (PPARs), modulatori della risposta antinfiammatoria. Sarà inoltre valutata l'espressione dell'enzima istone

demetilasi KDM6A che è coinvolto nella riduzione di espressione del PPAR $\gamma$  (PMID: 29873146) e, come riportato in un recente studio, nel controllo epigenetico della risposta infiammatoria (PMID:34769347). L'elevata neurotossicità dei pesticidi potrebbe, quindi, attivare dei processi neuroinfiammatori, che, a lungo termine, potrebbero contribuire allo sviluppo di disordini neurodegenerativi. E' noto che patologie come il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer siano associate ad una componente neuroinfiammatoria in grado di alterare l'integrità dei tessuti. L'originalità e l'innovatività del progetto risiedono, quindi, nel tentativo di dimostrare che eventi che si verificano in una finestra critica per lo sviluppo dell'individuo, come l'età perinatale, lo predispongano al rischio di manifestare patologie croniche durante la vita adulta dovute a riprogrammazione dell'asse HPA o a sviluppo di neuroinfiammazione e neurodegenerazione. È interessante notare come negli ultimi anni sia andata crescendo la consapevolezza dello stretto legame tra disturbi del sonno e dei ritmi circadiani e sviluppo di malattie neurodegenerative (PMID: 35000606). Le malattie neurodegenerative determinano disfunzioni di sonno e ritmi circadiani, peggiorando l'evoluzione del processo neurodegenerativo e innescando un meccanismo che porta ad un progressivo reciproco rinforzo dei processi patologici. Il progetto potrebbe, quindi, avere un'importante ricaduta sociale considerato che l'insonnia rappresenta una condizione assai debilitante e molto comune, ad alto impatto economico e sociale e alla luce dell'aumentata incidenza di disordini degenerativi in età precoce.

## Procedure sperimentali

*WPI*- Gli esperimenti verranno eseguiti su topi inbred (C57BL6/J). Topi maschi e femmine saranno alloggiati in gabbie da riproduzione con ciclo luce / buio 12:12 (LD, luce alle 8:00) e temperatura di 25 °C, con libero accesso a cibo e acqua. Un totale di 6 topi femmine e 2 maschi saranno utilizzati come fondatori, per un totale di 60 topi (prole, 30 maschi e 30 femmine) che saranno utilizzati per gli esperimenti. Il CPF (6 mg / kg) (Chem Service, West Chester, PA) o l'olio di arachidi (veicolo), saranno somministrati alle madri (n = 6) da 2 settimane prima dell'accoppiamento fino allo svezzamento mediante gavage. Per testare l'efficacia del trattamento con CPF, verranno testati i livelli di AChE nel siero e nell'omogenato di cervello. Due topi per nidiata alla nascita saranno sacrificati mediante decapitazione e sangue e cervello saranno immediatamente prelevati. L'attività di AChE sarà determinata con il metodo spettrofotometrico di Ellman (PMID: 13726518), determinando il contenuto proteico totale utilizzando l'albumina sierica bovina come standard (PMID: 14907713). Gli effetti a lungo termine dell'esposizione perinatale al CPF saranno testati in topi esposti e topi di controllo (maschi e femmine, n = 10 da ciascun gruppo, per evidenziare possibili differenze di genere), secondo il seguente schema sperimentale:

- A 14 settimane, l'eventuale disfunzione dell'asse HPA dell'adulto sarà valutata mediante quantificazione dei livelli di corticosterone (CORT). Campioni di sangue (0,1 ml) saranno raccolti dalla coda in anestesia generale. I livelli di CORT saranno quantificati con un kit ELISA (Enzo Life Sciences Inc., USA) a 4 diversi punti temporali giornalieri.
- A 20 settimane, gli animali saranno sottoposti ad un intervento chirurgico per la valutazione del fenotipo ipnico e respiratorio durante il sonno. I topi verranno impiantati con elettrodi elettroencefalografici (EEG) ed elettromiografici (EMG), come precedentemente descritto (PMID:21286242). Dopo 2 settimane di recupero, il fenotipo respiratorio durante il sonno verrà valutato in modo non invasivo in una camera pletismografica (modello PLY4223, Buxco, USA,

modificato per l'uso nei topi) per 8 ore. Successivamente, verranno registrati i segnali EEG ed EMG in condizioni basali per la discriminazione dello stato comportamentale (48 ore). Il fenotipo ipnico verrà studiato anche a seguito dell'esposizione degli animali a protocolli di stress: deprivazione di sonno per 6 ore con valutazione del recupero di sonno nelle 18 ore successive e cage switch test (topo esposto alla segatura appartenente ad un altro animale) con valutazione della tendenza a sviluppare insonnia psicogenica (PMID: 24033681).

La veglia, il sonno NREM e il sonno REM saranno discriminati analizzando visivamente i EEG ed EMG con una risoluzione di 4 secondi. L'analisi dell'attività ventilatoria consentirà la quantificazione delle apnee durante il sonno (PMID: 24950219). L'analisi dei dati verrà effettuata mediante software Labview (National Instruments, USA), Matlab (the Mathworks, Inc, USA), e SPSS (SPSS Inc., USA).

- Al termine delle procedure sperimentali, un sottogruppo di animali verrà esposto ad un protocollo di stress acuto con prelievo di sangue terminale per la successiva valutazione dei livelli di CORT. Un altro sottogruppo verrà sacrificato con overdose di anestetico e gli ippocampi dissezionati verranno inviati alla WP2 per la successiva valutazione dell'espressione genica.

*WP2*- L'RNA totale verrà estratto dall'ippocampo degli animali studiati con apposite colonnine (Zymo Research). I campioni di RNA verranno digeriti con DNase RNase-free enzyme e successivamente retro-trascritti con l'enzima trascrittasi inversa, ottenendo DNA complementare. Mediante una reazione di Real-time PCR, l'espressione genica relativa dei geni codificanti per GR e per le citochine pro-infiammatorie (IL-6, IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$ ), PPARs e KDM6A verrà normalizzata rispetto all'espressione del gene house-keeping (GADPH), come precedentemente descritto (PMID:34903845; PMID: 34769347).

## Piano di attività dell'assegnista

Il progetto di ricerca richiede di mettere in campo competenze diverse: da una parte è richiesta una notevole esperienza relativa allo studio della fisiologia del sonno con estese competenze nell'acquisizione di biosegnali e utilizzo di tecniche di microchirurgia; dall'altra, è richiesta esperienza nello studio di marcatori di neuroinfiammazione mediante l'impiego di tecniche molecolari.

L'attività dell'assegnista di ricerca si articolerà in due diverse fasi, così suddivise nell'arco dei 12 mesi previsti:

- WP1- 7 mesi: si occuperà della gestione degli accoppiamenti degli animali usati come fondatori e della somministrazione del trattamento alle madri. Si occuperà successivamente di impiantare EEG ed EMG negli animali sperimentali e di registrare i biosegnali e di eseguire le analisi sui livelli di CORT nel sangue.
- WP2- 4 mesi: si occuperà dell'estrazione dell'RNA dai tessuti selezionati e delle analisi di espressione genica di *GR*, *IL-6*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *PPARs* e *KDM6A*.

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 molecolari; 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, e nei laboratori del co-PI, 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 respiratorio durante il sonno di topi C57B6J maschi e femmine trattati con CPF o con veicolo e le analisi di espressione genica.

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.
- Impiego di tecniche di valutazione dell'espressione genica come la Real-Time PCR

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.