

# **STUDIO DEGLI EFFETTI DELLA RIDUZIONE DEL SONNO MATERNO IN GRAVIDANZA SULLA SALUTE DEI FIGLI IN ETÀ ADULTA**

## **Progetto di ricerca**

Diversi studi hanno recentemente dimostrato che le fasi iniziali della vita rappresentano un periodo critico per lo sviluppo, con la potenzialità di lasciare un'impronta sul resto delle nostre vite. Fattori che agiscono nel periodo perinatale possono determinare cambiamenti permanenti nel feto, che inizialmente gli consentono di superare la criticità, e sopravvivere nel breve termine, ma che possono predisporlo allo sviluppo di patologie durante la vita adulta (Reynolds et al., 2013). L'esposizione a stress perinatale è stata associata con un ampio spettro di alterazioni della salute che si manifestano durante la vita adulta. Molti studi hanno, infatti, dimostrato le conseguenze negative dell'esposizione a diversi fattori di stress perinatale sulla neurogenesi, sul metabolismo e sul sistema cardiovascolare della prole in età adulta (Matthews et al., 2011; Oomen et al., 2009; Pankevich et al., 2009). Sono, invece, piuttosto scarsi gli studi che si sono occupati di indagare le conseguenze dell'esposizione allo stress perinatale sul fenotipo ipnico e sulle funzioni cognitive (Lo Martire et al., 2020). Una recente revisione della letteratura ha evidenziato come l'esposizione a stress perinatale possa predisporre l'individuo adulto allo sviluppo di insonnia; l'effetto potrebbe essere mediato da modificazioni epigenetiche (Palagini et al., 2015). Alla luce dell'elevata prevalenza dei disturbi del sonno e della loro influenza sulla morbilità cardiorespiratoria e metabolica nella popolazione generale, risulta di particolare interesse indagare l'esistenza di una relazione tra l'esposizione a stress perinatale e possibili alterazioni del fenotipo ipnico nell'adulto. Tra i numerosi fattori di stress perinatale rivestono un ruolo importante le alterazioni del ciclo veglia-sonno che affliggono le madri durante la gravidanza e nel periodo immediatamente successivo al parto. La National Sleep Foundation ha riportato che l'84% delle donne sviluppa insonnia durante la gravidanza e il periodo post-parto. Nonostante sia ben noto che i disturbi del sonno possano comportare un ampio

spettro di alterazioni nei soggetti in cui si sviluppano, gli effetti della riduzione del sonno materno in gravidanza sullo sviluppo di disordini del sonno dei figli, una volta divenuti adulti, sono molto meno noti, sebbene il numero di studi sia in aumento negli ultimi anni (Natan Pires et al., 2021). In particolare, si è visto che nel ratto la riduzione del sonno materno durante la gravidanza (tra il 14° e il 19° giorno di gestazione) determina un profilo di crescita alterato e iperattività nella prole ad alcuni giorni di distanza dalla nascita rispetto agli animali di controllo, nonché assunzione di comportamenti classificati “a rischio” (Radhakrishnan et al., 2015). Altri studi, condotti sempre nel ratto, hanno evidenziato che la deprivazione del sonno totale o limitata al sonno con movimenti oculari rapidi (REM) durante la gravidanza (dal 15° al 20° giorno di gestazione) induce alterazioni del ciclo veglia-sonno della prole a 20 giorni dalla nascita, con un rapporto più elevato tra la percentuale di tempo spesa in sonno REM e in sonno senza movimenti oculari rapidi (NREM), una riduzione significativa della percentuale di veglia, una maggiore durata dei cicli del sonno, una minore frequenza di risvegli e una minore latenza di comparsa del sonno e una ridotta potenza spettrale nella banda delta dell'EEG, tutti indicatori di immaturità cerebrale e di ritardo nello sviluppo cerebrale dei networks coinvolti nella regolazione della veglia e del sonno (Aswathy et al., 2018b, 2018a). Tuttavia, solo pochi lavori hanno suggerito che fattori di stress perinatale possano portare a persistenza dei disturbi del sonno anche durante la vita adulta (Lo Martire et al., 2020; Palagini et al., 2015). Il link tra stress perinatale (riduzione del sonno materno) e sviluppo di disordini del sonno nella prole divenuta adulta potrebbe essere rappresentato da una riprogrammazione dell'asse HPA a livello ippocampale, dovuta all'attivazione di meccanismi epigenetici (Lucassen et al., 2013). Lo stress materno produce una sovraesposizione del feto ai glucocorticoidi che, attraverso meccanismi epigenetici, potrebbe determinare una sotto-espressione cronica dei recettori ippocampali per i gluco- e mineralcorticoidi. Questo effetto porta ad una riduzione dell'inibizione a feedback che l'ippocampo normalmente esercita sulla risposta ormonale allo stress, con iperattivazione cronica dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) (Weaver et al., 2004). L'iperattivazione

cronica dell'asse HPA determina un aumento dei livelli di glucocorticoidi, in particolare il cortisolo, che sono noti esercitare effetti centrali sul sonno (Lo Martire et al., 2020). I glucocorticoidi, infatti, influenzano il pattern di sonno, aumentando la veglia e diminuendo il sonno, attraverso l'ormone rilasciante la corticotropina (CRH), (Chang & Opp, 2001). Le interazioni epigenetiche gene-ambiente potrebbero, quindi, rappresentare il legame mancante tra gli eventi della prima infanzia e il fenotipo ipnico dell'adulto. La scoperta di un legame epigenetico tra l'esposizione perinatale a fattori stressanti, anche lievi, e le alterazioni ipniche degli adulti potrebbe aprire la strada ad un nuovo campo di ricerca per il trattamento dei disturbi del sonno. L'iperproduzione di cortisolo conseguente alla riprogrammazione dell'asse HPA nell'adulto determina anche modificazioni epigenetiche a carico di un altro gene stress-correlato, il gene FKBP5, la cui metilazione è ad esempio presente nei pazienti affetti da disturbo post-traumatico da stress e che presenta una trasmissione transgenerazionale (Yehuda et al., 2016). Il gene FKBP5 codifica per una proteina con funzione di co-chaperone associata alla modulazione del recettore dei glucocorticoidi. Alterazioni epigenetiche a carico di questo gene sono risultate associate ad una maggiore suscettibilità a sviluppare disordini psichiatrici (Mendonça et al., 2021). Inoltre, la metilazione del gene FKBP5 avviene sia nelle cellule ippocampali che nelle cellule del sangue (Ewald et al., 2014). Questo aspetto lo rende particolarmente adatto ad essere utilizzato come biomarcatore nell'individuo adulto di una storia pregressa di esposizione a stress perinatale. La presenza di disturbi del sonno della prole, una volta divenuta adulta, potrebbe, inoltre, favorire l'instaurarsi di uno stato di neuroinfiammazione cronica, a sua volta associato ad un aumentato rischio di sviluppo di malattie neurodegenerative (Leng & Edison, 2020). La deprivazione del sonno materno è stata dimostrata essere in grado di compromettere il neuro-sviluppo della prole ed in particolare dell'ippocampo (Natan Pires et al., 2021). La deprivazione intermittente di sonno durante la gravidanza è responsabile dell'aumento dei marcatori pro-infiammatori e della diminuzione dei marcatori antinfiammatori nell'ippocampo della prole, aspetti associati a ridotta neurogenesi ippocampale e ridotto apprendimento spaziale,

compromissione della memoria e anedonia (Zhao et al., 2014). Alcune ricerche hanno messo in evidenza che fattori di stress a cui le madri vengono esposte durante la gravidanza potrebbero, attraverso l'alterazione dell'asse HPA e dei meccanismi di controllo autonomico, (Rosa et al., 2018) aumentare il rischio di sviluppo di disordini respiratori nella prole già durante l'infanzia (Wright, 2010). È stato dimostrato che sia la frammentazione di sonno che la riduzione di sonno possono esacerbare le patologie respiratorie associate al sonno, aumentando sia la lunghezza che la fisiopatologia delle apnee durante il sonno (Bonnet & Arand, 2003). Infine, le alterazioni del sonno materno possono influire anche sul microbiota intestinale della prole. Questo aspetto è particolarmente rilevante, vista la notevole importanza della funzionalità dell'asse intestino-cervello (Cryan et al., 2019). Il microbiota si sviluppa nel periodo neonatale, sebbene recenti studi asseriscano che batteri siano presenti nell'intestino fetale prima della nascita (Tamburini et al., 2016). Recentemente è emerso come alterazioni del sonno siano potenzialmente in grado di indurre disbiosi intestinale (Han et al., 2022). Poiché il microbiota traccia la sua linea evolutiva precocemente, è ragionevole supporre che l'esposizione a fattori stressanti, come la riduzione del sonno materno durante la gravidanza, potrebbe avere degli effetti a lungo termine sul microbiota intestinale nella prole, lasciando un'impronta duratura sul rischio di sviluppare patologie durante la vita adulta (Wang et al., 2014)

Alla luce di queste premesse, questo progetto si pone l'obiettivo di studiare, in un modello murino, gli effetti di uno stress perinatale (la frammentazione del sonno materno durante la gravidanza) sulla salute dell'individuo adulto. In particolare, lo stato di salute di topi maschi e femmine adulti, figli di madri che hanno subito una frammentazione del sonno materno durante la gravidanza verrà valutato studiando:

- 1) la micro e la macrostruttura del sonno, nonché l'eventuale presenza di disturbi respiratori durante il sonno;
- 2) i meccanismi molecolari alla base dei disordini ipnici osservati nell'adulto;

- 3) alterazioni comportamentali come disturbi della memoria e ansia-correlati;
- 4) la presenza di neuroinfiammazione;
- 5) le caratteristiche della composizione del microbiota intestinale.

I meccanismi alla base delle alterazioni prodotte dallo stress perinatale sulla salute dell'adulto verranno indagati studiando la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) attraverso la misura dei livelli plasmatici dei glucocorticoidi e i meccanismi epigenetici che modulano a lungo termine l'espressione dei geni coinvolti nella riprogrammazione dell'attività dell'asse HPA (geni codificanti per i recettori di mineralcorticoidi e glucocorticoidi). Si indagherà inoltre la presenza di alterazioni del pattern di metilazione del DNA del gene FKBP5, potenziale biomarcatore per gli adulti di storia di esposizione a stress perinatale. In questo progetto verrà posta particolare attenzione ad eventuali differenze di genere negli effetti esercitati dallo stress perinatale sulla salute dell'adulto. Infatti, numerose evidenze indicano come gli effetti prodotti dall'esposizione allo stress in età perinatale possano presentare livelli significativamente diversi nei due sessi (Soztutar et al., 2016). Inoltre, verrà verificata la persistenza transgenerazionale delle alterazioni osservate, sottolineando come le modificazioni epigenetiche possano rappresentare un meccanismo di programmazione delle patologie dell'adulto nel passaggio da una generazione all'altra (Ambeskovic et al., 2020).

### **Procedure sperimentali**

Gli esperimenti verranno eseguiti su topi inbred (C57BL6/J). Topi maschi e femmine saranno alloggiati in gabbie da riproduzione in policarbonato con ciclo luce / buio 12:12 (luce alle 8:00) e temperatura impostata a 25 °C e con libero accesso a cibo e acqua. La frammentazione del sonno materno (usata come paradigma dello stress perinatale) sarà eseguita secondo protocolli precedentemente pubblicati (Kaushal et al., 2013; Wang et al., 2014b) utilizzando un dispositivo validato basato sulla stimolazione tattile

intermittente dei topi a cui viene lasciata completa libertà di movimento. Il dispositivo (Campden instruments, UK) è assimilabile ad una gabbia comunemente utilizzata per l'alloggiamento di topi in cui è stata inserita una barra motorizzata, installata sul fondo della gabbia che, silenziosamente, si muove da un lato all'altro della gabbia ogni 2 minuti, stimolando in questo modo il risveglio dell'animale. Questo metodo garantisce un'interruzione cronica del sonno, prevenendo la necessità di contatto e intervento umano, eliminando la necessità dell'introduzione di oggetti estranei o del contatto degli animali durante il sonno e di conseguenza possibili fonti di stress per l'animale. Topi adulti a 3 mesi di età saranno utilizzati per la riproduzione e i maschi saranno separati dopo che l'ispezione delle femmine abbia rivelato la presenza di un tappo mucoso a fecondazione avvenuta. Questo momento verrà considerato come il primo giorno di gestazione (GD1). Le gravide verranno a questo punto suddivise in due gruppi sperimentali: madri di controllo, non sottoposte a deprivazione di sonno (SC, control sleep) e madri sottoposte a deprivazione di sonno all'interno della gabbia di frammentazione (SF, sleep fragmented). Le fattrici SC saranno alloggiare in gabbie standard mentre le fattrici SF saranno poste in gabbie analoghe dotate di dispositivo di frammentazione del sonno. Le fattrici SF saranno esposte ad un paradigma di frammentazione del sonno per 5 giorni (da GD14 a GD19) durante il loro periodo di riposo (8 ore al giorno durante il periodo di luce, essendo i topi animali notturni). I figli maschi e femmine delle madri SC e SF saranno poi utilizzati per gli studi successivi. Gli esperimenti saranno eseguiti su animali di entrambi i sessi al fine di mettere in evidenza eventuali differenze di genere. Alcune delle femmine appartenenti alla generazione F1 verranno invece allevate per poi essere riaccoppiate con nuovi fattori al fine di generare una generazione F2, in cui valutare la persistenza intergenerazionale delle eventuali alterazioni fenotipiche osservate. Il protocollo sperimentale verrà articolato nel seguente modo:

**WP 1** profilo dei glucocorticoidi e fenotipo ipnico e respiratorio durante il ciclo veglia-sonno.

Gli effetti della frammentazione del sonno materno saranno testati in topi adulti, figli di madri sottoposte a frammentazione di sonno in gravidanza e figli di madri di controllo.

Profilo dei glucocorticoidi (14 settimane di età). L'iperattivazione cronica dell'asse HPA dell'adulto a seguito dell'esposizione delle madri a riduzione del sonno in gravidanza sarà valutata mediante quantificazione dei livelli di corticosterone, tramite saggi immunoenzimatici.

Fenotipo ipnico e respiratorio (20 settimane di età). Gli stessi topi su cui si è valutato il profilo dei glucocorticoidi verranno impiantati a 20 settimane di età con dispositivi per la registrazione simultanea di elettroencefalogramma (EEG) ed elettromiogramma (EMG) per la discriminazione dello stato comportamentale. Dopo 2 settimane di recupero, i segnali di EEG, EMG, e attività ventilatoria verranno registrati in modo non invasivo in una camera pletismografica per 8 ore.

Il ciclo veglia-sonno sarà studiato in condizioni basali (48 ore di registrazioni continue) nell'animale indisturbato e libero di muoversi nel suo ambiente di registrazione ed eventuali alterazioni nell'omeostasi di sonno verranno testate utilizzando un protocollo di deprivazione di sonno, mediante tecnica gentle handling e di cage switch.

**WP2** profilo dei glucocorticoidi e fenotipo ipnico e respiratorio durante il ciclo veglia-sonno in animali di II generazione F2.

Tutti gli esperimenti previsti in WP1 verranno replicati anche su animali appartenenti alla seconda generazione (F2), con la medesima numerosità prevista per ciascun gruppo sperimentale per valutare la persistenza intergenerazionale delle alterazioni osservate.

**WP3** test comportamentali (**eseguiti sui medesimi gruppi sperimentali in WP1 e WP2**). Le funzioni cognitive saranno testate con il Morris Water Maze a **18 settimane di età**, per valutare la memoria spaziale e l'apprendimento dipendente dall'ippocampo. L' Elevated Plus maze (EPM) o Labirinto a croce elevato verrà, invece, utilizzato per studiare l'emozionalità in roditori sfruttando il conflitto del roditore tra l'avversione per gli spazi aperti e l'istinto di esplorare ambienti nuovi. Il test Y maze verrà utilizzato per valutare la memoria a breve termine nei topi. Questo test misurerà inoltre la volontà dei roditori di esplorare nuovi ambienti.

#### **WP4 analisi del microbiota**

Si procederà alla raccolta delle feci per la valutazione del microbiota in tutti gli animali di WP1 e WP2. La raccolta avverrà nel momento in cui gli animali verranno alloggiati in gabbia singola subito prima dell'intervento finalizzato all'impianto degli elettrodi EEG ed EMG.

**WP5** valutazione post-mortem della neuroinfiammazione, analisi epigenetiche e molecolari (**eseguiti sui medesimi gruppi sperimentali in WP1 e WP2**).

Al termine delle procedure sperimentali, i topi di WP1 e 2 in anestesia generale verranno sacrificati tramite metodica indolore (overdose di anestetico, isoflurano 4% in O<sub>2</sub>), i loro cervelli verranno espianati e i loro ippocampi destro e sinistro dissezionati per la valutazione dello stato di metilazione dei geni GR e FKBP5 o per le indagini immunohistochimiche. Inoltre, per testare la riprogrammazione dell'asse HPA, i livelli di espressione genica del gene codificante per GR verranno valutati mediante Real-Time PCR. Al fine di verificare l'instaurarsi di un quadro di neuroinfiammazione, verranno valutati i 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. Per ridurre il numero di animali necessari ad effettuare queste valutazioni, un ippocampo verrà destinato agli studi di metilazione ed espressione genica e l'altro alle indagini immunohistochimiche. Un marcatore di attivazione della microglia è rappresentato da AIF-1. Verranno, mediante immunofluorescenza, contate le cellule AIF-1 positive e la densità di queste cellule verrà considerata indicativa di attivazione della microglia (Galvani et al., 2021).

Le procedure sperimentali sotto descritte verranno eseguite presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM).

## **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 e di valutazione del fenotipo comportamentale mediante l'impiego di test comportamentali; dall'altra, è richiesta esperienza nello studio di espressione genica di geni chiave nella determinazione della risposta allo stress (GR), di geni codificanti per marcatori di neuroinfiammazione e nella valutazione del profilo di metilazione del DNA di alcuni geni al fine di identificare i meccanismi molecolari alla base delle alterazioni fenotipiche osservate. mediante l'impiego di tecniche molecolari. E' inoltre richiesta una esperienza di base nell'impiego di tecniche necessarie per lo studio del microbiota e di tecniche di immunohistochimica per la valutazione istologica dell'attivazione della microglia.

L'attività dell'assegnista di ricerca prevederà lo svolgimento delle seguenti attività nell'arco dei 18 mesi previsti:

- gestione degli accoppiamenti degli animali usati come fondatori e della frammentazione del sonno materno in gravidanza tra il giorno 14 e il giorno 19 di gestazione. Si occuperà successivamente di impiantare EEG ed EMG negli animali sperimentali figli di madri esposte a e di registrare i biosegnali e di eseguire le analisi sui livelli di corticosterone nel sangue. Si occuperà altresì dell'impiego di test comportamentali al fine di verificare se la frammentazione del sonno materno in gravidanza abbia la potenzialità di arrecare alterazioni cognitive o disturbi stress-correlati nella prole una volta diventata adulta.
- Al termine della registrazione dei biosegnali si occuperà dell'estrazione dell'RNA e del DNA dai tessuti cerebrali di interesse e di eseguire analisi di espressione genica di marcatori di neuroinfiammazione (*GR, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PPARs e KDM6A*) e di identificare il profilo di

metilazione del gene FKBP5 e dei geni codificanti per il recettore dei glucocorticoidi e dei mineralcorticoidi.

- Durante gli esperimenti, si occuperà di raccogliere le feci al fine di studiare la composizione del microbiota e sue eventuali alterazioni mediante tecniche validate.

Il titolare dell'assegno collaborerà alle seguenti attività: gestione della colonia murina; 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 NREM 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, 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 ipnico e respiratorio durante il sonno di topi C57Bl/6J maschi e femmine figli di madri sottoposte a deprivazione del sonno materno in gravidanza o di controllo e le analisi di espressione genica e di metilazione del DNA nonché le analisi sulla composizione del microbiota.

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
- Impiego di tecniche di deprivazione di sonno
- 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
- Impiego di tecniche per la valutazione del profilo di metilazione di specifici geni
- Tecniche per lo studio della composizione del microbiota.

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 risultati ottenuti.