PROGETTO DI RICERCA: “APPROCCI BIOMOLECOLARI PER LA CARATTERIZZAZIONE DEGLI EFFETTI NEUROTOSSICI DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI”

Tutor: Dott.ssa Fabiana Morroni

Il presente progetto per l'assegno di ricerca è parte integrante del Progetto MIUR PRIN 2017 “ENDOCRINE DISRUPTORS: INVESTIGATION OF THE EFFECTS ON THE IMMUNE AND NERVOUS SYSTEMS (EDoNIS)” (2017MLC3NF – CUP J34I19001020005, Responsabile scientifico: Emanuela Corsini, Responsabile Unità Operativa Dott.ssa Fabiana Morroni). Gli interferenti endocrini o Endocrine Disrupting Chemicals (EDC) sono stati definiti dalla *U.S. Environmental Protection Agency* come “qualsiasi sostanza esogena in grado di interferire con la sintesi, la secrezione, il trasporto, il metabolismo, il legame recettoriale o l'escrezione di una sostanza endogena con azione ormonale normalmente in grado di garantire l'omeostasi, il normale sviluppo e la funzione riproduttiva di un individuo”. Gli EDC costituiscono un ampio ed eterogeneo gruppo di sostanze, tra le quali figurano contaminanti ambientali persistenti, composti utilizzati in prodotti industriali e di consumo di uso comune, nonché sostanze di origine naturale. Il meccanismo d'azione tossica degli EDC è differente a seconda della sostanza considerata. I principali bersagli descritti sono il recettore per gli estrogeni (ER), con azione prevalentemente di agonista, il recettore per gli androgeni (AR), con azione prevalentemente antiandrogenica, il recettore per il progesterone, il recettore per l'ormone tiroideo e il recettore per l'acido retinoico (Marty et al., 2018). Gli EDC rappresentano una sfida per gli studi tossicologici classici perché, piuttosto che esprimere i loro effetti in forma di patologia tissutale, disturbi clinici o morte, essi possono semplicemente modulare alcuni parametri dell'omeostasi corporea. Il sistema endocrino infatti è una rete complessa di comunicazioni tra il sistema nervoso e funzioni corporee fondamentali come la riproduzione, l'immunità, il metabolismo e il comportamento. Negli ultimi decenni i paesi industrializzati hanno subito un aumento significativo di malattie, come cancro, allergie, autoimmunità e disturbi neurologici, che possono essere tutte collegate ad alterazioni immunitarie e neuronali. Si ritiene che i fattori ambientali, inclusi gli EDC, siano tra i principali fattori responsabili di questa maggiore prevalenza (Nahta et al, 2015).

La maggior parte degli studi sugli EDC si è focalizzata principalmente sulla tossicità riproduttiva e dello sviluppo, pertanto sono necessari ulteriori indagini per dimostrare l'impatto delle esposizioni ad EDC al di fuori dell'asse riproduttivo e in particolare sul sistema nervoso, per comprendere meglio se può essere compromesso o deregolato con un conseguente sviluppo, ad esempio, di processi neurodegenerativi (Ferraz da Silva et al., 2018). Sebbene sia ormai noto che l'esposizione precoce a EDC sia associata a conseguenze neurocomportamentali, in qualche modo i loro effetti possono essere enormemente amplificati nella vita adulta. Nella gran parte, questi effetti sembrano essere collegati alle loro proprietà estrogene e antiandrogena. A causa dell'enfasi posta sui risultati della tossicità dello sviluppo, non è ancora noto come gli EDC possano alterare la funzionalità del cervello che invecchia. Dal momento che la funzione tiroidea, gli estrogeni e gli androgeni endogeni svolgono un ruolo chiave nella plasticità cerebrale, e tutti diminuiscono con l'invecchiamento e sono particolarmente vulnerabili agli EDC, si può ipotizzare che questi composti possano concorrere all'invecchiamento cerebrale (Weiss, 2011). Studi epidemiologici ed esperimenti su animali hanno

indicato una correlazione tra esposizione a EDC e alterazioni cognitive e comportamentali (Tian et al., 2010). Sulla base di queste evidenze, numerosi studi hanno iniziato a caratterizzare i meccanismi cellulari e molecolari alla base del danno cerebrale mediato da EDC, come disfunzione mitocondriale, neuroinfiammazione e aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (Rajamani et al., 2017). Tuttavia, questi meccanismi sono ancora poco chiari e in fase di studio.

Tra i più recenti meccanismi studiati, senza dubbio, l'analisi del ruolo dei microRNA (miRNA) come marchio epigenetico di importanza funzionale ha stimolato sempre di più l'attenzione dei ricercatori. I miRNA sono piccole molecole endogene di RNA non codificante a singolo filamento, che svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale. È interessante notare che alcuni studi dimostrano l'effetto di diversi EDC sull'espressione dei miRNA e queste variazioni del profilo di espressione dei miRNA sono associate con malattie del sistema nervoso centrale e dell'asse riproduttivo, nonché disturbi metabolici (Derghal A et al., 2016).

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è orientato allo sviluppo di nuovi approcci sperimentali per identificare e caratterizzare gli effetti degli EDC sul sistema nervoso, in modo da poter fornire nuove valutazioni sulla tossicità degli EDC e nuove strategie di screening sensibili, specifiche, quantitative ed efficienti che utilizzano metodi alternativi alla sperimentazione animale e che potrebbero essere utili come base scientifica per il processo decisionale in ambito di protezione della salute umana. Lo studio prevede la valutazione di sei differenti EDC che verranno valutati in sistemi neuronali *in vitro*, andando a studiare i singoli meccanismi di tossicità con particolare riferimento alla modulazione di geni implicati nella sopravvivenza neuronale, nell'attività del reticolo endoplasmatico, dei mitocondri oltre al profilo di espressione di diversi miRNA. La presente ricerca sarà articolata in tre parti fondamentali:

- A.** Raccolta di dati esistenti, selezione degli EDC e valutazione dell'esposizione
- B.** Studio *in vitro* dei meccanismi e dei fattori per il controllo della sopravvivenza neuronale e dei processi neurodegenerativi indotti dagli EDC
- C.** Ruolo dei miRNA nella modulazione delle risposte di cellule neuronali trattate con diversi EDCs

A. *Raccolta di dati esistenti, selezione degli EDC e valutazione dell'esposizione*

Nella prima fase della sperimentazione verrà definito l'elenco degli EDC da testare. La selezione si baserà sui dati della letteratura (ad es. QSAR, modelli *in silico*, ecc.), sull'elenco di sostanze chimiche sviluppato nell'ambito della strategia dell'UE per gli EDC, sulla presenza di dati umani, sui costi e disponibilità commerciale. Considerando che il problema delle miscele di EDC rappresenta una grande sfida con implicazioni sia nelle scienze di base che a livello normativo, si prenderanno in considerazione anche esposizioni miste e interazioni tra diversi EDC, con la consapevolezza che qualsiasi miscela scelta non riflette necessariamente l'esposizione nella vita reale, poiché inevitabilmente conterrà solo un piccolo numero di noti o sospetti EDC (Kortenkamp, 2014).

B. *Studio in vitro dei meccanismi e dei fattori per il controllo della sopravvivenza neuronale e dei processi neurodegenerativi indotti dagli EDC*

Nonostante rilevanti studi condotti sugli EDC, i dati ottenuti non hanno portato a evidenze scientifiche inoppugnabili. Diversi composti sono dotati di breve emivita, altri hanno bassi pesi molecolari, altri ancora agiscono mediante metaboliti; pertanto, l'identificazione di queste sostanze non è semplice e richiede, oltre a un'adeguata strumentazione, anche un *background* clinico rilevante. Un numero limitato di studi ha iniziato a caratterizzare i meccanismi cellulari e molecolari alla base del danno cerebrale mediato da EDC. Per questo la ricerca sarà orientata alla valutazione dei parametri di danno neuronale che rappresentano l'innescò dei meccanismi di morte cellulare in termini di apoptosi e necrosi e dell'attivazione di vie biochimiche coinvolte nella morte neuronale, come le chinasi attivate dallo stress (SAPKs) e le cistein-proteasi (caspasi e calpaina). Verrà inoltre valutato il coinvolgimento dello stress ossidativo e della disfunzione mitocondriale nei meccanismi di neurotossicità indotti dagli EDC.

C. Ruolo dei miRNA nella modulazione delle risposte di cellule neuronali trattate con diversi EDC

In una fase successiva del progetto verrà valutata la capacità dei differenti EDC di modulare l'espressione dei miRNA, ed eventualmente di evidenziare come i miRNA possano agire come nesso causale tra l'esposizione a EDC e i loro effetti sulla salute, in modo tale da poter essere impiegati come strumento diagnostico e prognostico. I miRNA sono una classe fondamentale di regolatori dell'espressione genica che, modulando circa un terzo dell'intero genoma, intervengono in molte attività biologiche che vanno dalla crescita e differenziazione delle cellule all'apoptosi. Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che un singolo miRNA è in grado di regolare l'espressione di diversi geni e che un determinato gene può essere regolato da miRNA differenti che agiscono in maniera sinergica tra loro (Wahlestedt, 2013).

Il presente progetto di ricerca si propone di caratterizzare il profilo di espressione dei miRNA in cellule neuronali umane e di stabilire la rilevanza di miRNA specifici nella risposta di queste cellule all'esposizione ai differenti EDCs. In particolare, si propone di:

- analizzare se e come il profilo di espressione dei miRNA in cellule neuronali umane venga modulato in risposta a stimoli dovuti all'esposizione a EDC;
- definire la rilevanza funzionale delle variazioni di espressione di singoli miRNA nella risposta delle cellule neuronali a stimoli dovuti all'esposizione a differenti EDC.

Bibliografia

- Derghal A, et al. An Emerging Role of micro-RNA in the Effect of the Endocrine Disruptors. *Front Neurosci* 10:318, 2016.
- Ferraz da Silva I, et al. Organotins in Neuronal Damage, Brain Function, and Behavior: A Short Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:366, 2018.
- Kortenkamp A. Low dose mixture effects of endocrine disrupters and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr Opin Pharmacol* 19:105, 2014.
- Marty MS et al. Distinguishing Between Endocrine Disruption and Non-Specific Effects on Endocrine Systems. *Regul Toxicol Pharmacol.* 99:142-158, 2018.
- Nahta R, et al. Mechanisms of environmental chemicals that enable the cancer hallmark of evasion of growth suppression. *Carcinogenesis* 36:S2, 2015.
- Rajamani U, et al. Endocrine disruptors induce perturbations in endoplasmic reticulum and mitochondria of human pluripotent stem cell derivatives. *Nat Commun* 8:219, 2017.

Tian YH, et al. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse* 64:432, 2010.

Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nat Rev Drug Discovery* 2013; 12:433–46.

Weiss B. Endocrine disruptors as a threat to neurological function. *J Neurol Sci* 305:11, 2011.

PIANO DI FORMAZIONE

A fronte di diversi studi incentrati sugli effetti degli interferenti endocrini (EDC) sulla fauna selvatica e sugli animali da esperimento, i dati sui possibili danni per la salute umana sono ancora limitati. In particolare, sono ancora da definire: 1) il meccanismo d'azione di molti EDC sui singoli assi endocrini; 2) i rischi reali di alterazione endocrina legati all'esposizione a singole sostanze o a miscele di sostanze diverse; 3) i livelli d'esposizione che possono provocare un'alterazione dei singoli assi endocrini nell'uomo; 4) i tempi d'esposizione necessari per provocare un'alterazione endocrina. Inizialmente, il titolare dell'assegno dovrà impiegare le metodiche necessarie per valutare la tossicità in linee cellulari neuronali umane trattate con i differenti EDC e per estrarre e quantificare proteine da linee cellulari trattate con diverse concentrazioni degli stessi. Successivamente, l'assegnista utilizzerà le metodiche necessarie per la valutazione dei parametri di bilancio ossidativo, infiammatorio e di morte cellulare; nonché la tecnica del Western Blotting per lo studio semiquantitativo dei pathway coinvolti. Verranno studiati sei differenti EDC appartenenti alle differenti classi, in particolare saranno selezionati per la loro affinità (agonista/antagonista) con i recettori degli androgeni, degli estrogeni e dei glucocorticoidi e saranno testati singolarmente e in miscela.

I meccanismi epigenetici, con particolare riferimento alle alterazioni dei microRNA (miRNA), possono modificare l'espressione genica in seguito ad esposizione a fattori esogeni. L'alterazione dell'espressione dei miRNA è un meccanismo di tossicità chiave per comprendere il processo patogenetico dovuto all'esposizione ad agenti tossici ambientali. Lo studio successivo riguarderà l'analisi del profilo di espressione dei miRNA mediante array specifici, i miRNA significativamente deregolati saranno poi analizzati singolarmente. Il titolare dell'assegno dovrà effettuare studi necessari per comprendere appieno il complesso meccanismo con cui i miRNA possono modulare l'espressione genica nel sistema cellulare impiegato. Questo studio permetterà all'assegnista di individuare i meccanismi che sottendono la neurotossicità a seguito dell'esposizione a EDC. Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che portano a disfunzione neuronale in funzione dell'esposizione a EDC è fondamentale per l'identificazione dei pericoli e la valutazione dei rischi associati ad essi.

Il piano di formazione proposto vuole fornire competenze specifiche da acquisire presso i Laboratori di Tossicologia Sperimentale del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie del nostro Ateneo, ad un laureato con il titolo di Dottore di Ricerca in Scienze Farmacologiche e affini. In particolare, il piano di formazione descritto si fonda essenzialmente sull'apprendimento delle conoscenze e delle metodiche sperimentali necessarie per: quantificare proteine nucleari e citoplasmatiche in modelli sperimentali *in vitro*; l'analisi biomolecolare della condizione infiammatoria e ossidativa cellulare e tissutale, nonché dell'attivazione dei pathway responsabili della morte cellulare; l'analisi del profilo di espressione dei miRNA con miRNA-microarray. Sulla base delle conoscenze acquisite, il destinatario dell'assegno dovrà poi impegnarsi a

sviluppare ricerche atte a definire i meccanismi comuni responsabili della tossicità degli EDC con particolare riferimento agli effetti sul sistema nervoso, nonché di identificare potenziali target. In particolare, i risultati ottenuti concorreranno a sviluppare nuovi test utili per fini regolatori, contribuendo allo sviluppo di strategie per testare gli EDC e valutarne i pericoli e i rischi associati.