

Struttura proponente: Dipartimento FaBiT

Titolo del Progetto di Ricerca per un Assegno biennale:

Indagine sul ruolo del sistema endocannabinoide nelle alterazioni dei meccanismi della gratificazione indotte da esperienze sociali precoci

Tutor (Docente referente): Prof. Patrizia Romualdi

Progetto di Ricerca

Il presente progetto per l'Assegno di Ricerca è parte integrante del progetto PRIN2017 "Early life social experiences and dysregulation of the brain reward system: The role of endocannabinoid transmission" – 2017SXEXT5_005 - CUP J34I19001040005.

I fattori ambientali e le esperienze sociali ed emotive precoci svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo dell'individuo influenzandone profondamente il comportamento e i substrati neurochimici e neuroendocrini. Diversi studi suggeriscono che adeguati stimoli sociali durante le prime fasi di vita postnatale sono cruciali per sviluppare appropriate competenze sociali e cognitive, mentre esperienze sociali avverse influenzano negativamente tali facoltà aumentando la suscettibilità allo sviluppo di patologie psichiatriche quali alcolismo, tossicodipendenza e disturbi del comportamento alimentare.

Il sistema endocannabinoide (eCB) è altamente espresso nel sistema nervoso centrale dei mammiferi e svolge un ruolo essenziale nello sviluppo neurale precoce, nella maturazione emozionale e cognitiva e nella regolazione dei meccanismi di gratificazione. Come i fattori ambientali, quali cure parentali e contesto sociale, influenzino il sistema eCB e regolino lo sviluppo emozionale ed affettivo dell'individuo è ancora da chiarire.

Questo progetto di ricerca utilizzerà approcci molecolari ed epigenetici per studiare il ruolo del sistema eCB nella regolazione dei circuiti cerebrali coinvolti nei processi di gratificazione da stimoli naturali o artificiali dopo esperienze sociali avverse o positive nelle prime fasi di vita. Per il raggiungimento di tale obiettivo verranno utilizzati tessuti provenienti da animali sottoposti a esperienze di arricchimento ed impoverimento sociale nelle prime fasi di sviluppo, in collaborazione con gruppi di Farmacologia comportamentale, che valuteranno contemporaneamente le conseguenze dell'arricchimento e dell'impoverimento sociale nelle prime fasi di sviluppo sui meccanismi della gratificazione da stimoli naturali (cibo palatabile, gioco sociale) e artificiali (alcol, nicotina).

I dati molecolari ed epigenetici ottenuti, insieme a quelli comportamentali, contribuiranno a definire il ruolo del sistema eCB nella modulazione degli effetti di diverse esperienze sociali sulla percezione degli stimoli gratificanti e dei comportamenti ad essi correlati, e a chiarire in quali neurocircuiti la sua regolazione (genica ed epigenetica) alterata contribuisca a modificare tali comportamenti.

La ricerca di stimoli gratificanti naturali è un meccanismo evolutivo necessario a garantire la sopravvivenza della specie. I farmaci di abuso, in virtù delle loro azioni farmacologiche, possono usurpare i meccanismi della gratificazione innescando patologie psichiatriche, inclusa la tossicodipendenza. In alcuni casi sono gli stimoli naturali stessi che, se sperimentati in particolari condizioni, possono determinare disturbi assimilabili alla dipendenza; ne sono esempio alcuni disturbi dell'alimentazione, quali il binge eating e la bulimia nervosa.

Alterazioni nei circuiti cerebrali che sottendono i processi di gratificazione sono, inoltre, tipiche di patologie psichiatriche quali depressione, schizofrenia, disturbo di attenzione e iperattività (ADHD). I fattori ambientali, e tra questi le esperienze sociali nelle prime fasi di vita postnatale, hanno un ruolo cruciale nel plasmare il cervello in via di sviluppo e possono contribuire ad aumentare la vulnerabilità o a favorire la resilienza verso lo sviluppo di questi disturbi.

Obiettivi del progetto e Risultati Attesi

In base alle conoscenze attuali, si ipotizza che una condizione precoce di scarsa interazione sociale possa contribuire ad esacerbare una o più condizioni patologiche legate ai meccanismi della gratificazione e che tali effetti derivino dalla disregolazione del sistema eCB. In particolare ci si aspetta una diminuzione della risposta nella cascata della AEA (anandamide) e del 2-AG (arachidonoilglicerolo) nei ratti soggetti ad impoverimento sociale. I dati molecolari e biochimici ottenuti nelle varie aree cerebrali permetteranno di individuare eventuali modifiche nell'assetto recettoriale, neuronale e sinaptico in seguito a diverse esperienze sociali, a confermare il ruolo del sistema eCB nella modulazione della percezione degli stimoli gratificanti e dei comportamenti ad essi correlati, e a chiarire in quali neurocircuiti la loro alterata regolazione possa contribuire a modulare tali comportamenti. Infine, gli esperimenti di epigenetica permetteranno di capire se eventuali alterazioni epigenomiche possano essere responsabili dei comportamenti osservati.

Il progetto si propone di fornire informazioni utili a far luce sui fattori che rendono i soggetti in età giovanile particolarmente inclini a comportamenti rischiosi, contribuendo quindi allo sviluppo di migliori strategie di prevenzione, a fornire indicazioni per lo sviluppo di farmaci per quei disturbi psichiatrici e ad identificare le regioni cerebrali e i neurotrasmettitori (con particolare focus sul sistema endocannabinoide) che contribuiscono a mediare l'impatto delle esperienze sociali sui processi della gratificazione. Infine l'analisi bioinformatica dei risultati potrà rivelare nuove correlazioni tra geni e proteine coinvolte in questi meccanismi.

Bibliografia:

1. Branchi e Cirulli, 2014. *Dev Psychobiol* 56:1661-74.
2. Cirulli et al. 2010. *Neurosci Biobehav Rev* 34:808-20.
3. Sale et al. 2014. *Physiol Rev* 94:189-234.
4. Chatterjee et al. 2007. *Brain Res* 1158:11-27.
5. Marco et al. 2013. *Neuropharmacol* 68:223-31.
6. Turecki et al. 2014 *Lancet Psychiatry* 1:461-6.
7. Zucher et al. 2008. *Pediatrics* 121:252-72.
8. Vartanian et al. 2014. *Int J Eat Disord* 47:620-9.
9. Jahng 2011. *Int J Dev Neurosci* 30:47-53.
10. Lomanowska et al. 2011. *Behav Brain Res* 220:91-9.
11. Lomanowska e Kraemer, 2014. *Behav Brain Res* 271:94-105.
12. Fattore et al. 2010. *Exp Neurol* 224:23-36.
13. Akirav 2013. *Neurosci Biobehav Rev* 37:2554-63.
14. Blaze et al. 2015. *Stress* 18:607-15.
15. Mehta et al. 2013. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:8302-7.
16. Franklin et al. 2010. *Biol Psychiatry* 68:408-15.
17. Jawahar et al. 2015 *Clin Epigenetics* 7:122.
18. Walker et al. 2015. *Curr Opin Neurobiol* 30:112-21.
19. Branchi e Alleva 2006. *Behav Brain Res* 172:299-306.
20. Branchi 2009. *Neurosci Biobehav Rev* 33:551-9.
21. Trezza et al. 2009. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:659-69.
22. Economidou et al. 2006. *Psychopharmacology* 183:394-403.
23. Fattore e Fratta 2013. *Curr Opin Neurobiol* 23:487-92.
24. De Guglielmo et al. 2015. *Neuropsychopharmacol* 40: 927-37.
25. Caffino et al., 2015. *Eur Neuropsychopharmacol* 25:1832-41.
26. Caputi et al. 2014. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*
27. Livak e Schmittgen 2001. *Methods* 25:402-8.

Programma Formativo

Animali (PND35) verranno sottoposti durante la 3a settimana di vita a diverse esperienze sociali e ambientali presso laboratori di farmacologia comportamentale e il presente progetto valuterà i loro effetti su: (i) livelli di espressione di CB1R, FAAH, 2-AG, PPAR α e PPAR γ e dei relativi trascritti; (ii) espressione del recettore dei glucocorticoidi ;(iii) eventuali modificazioni epigenetiche alla base delle alterazioni di espressione genica. Le stesse misurazioni verranno ripetute negli animali adolescenti (PND60).

Si otterranno 4 gruppi sperimentali che terranno conto di condizioni di stabulazione standard (controlli) in comunità, esposti a stress sociale (isolati per un breve periodo di tempo) nelle due condizioni precedenti.

Per gli studi di questo progetto i ratti saranno sacrificati, i cervelli prelevati e le aree cerebrali di interesse (corteccia prefrontale, amigdala, ippocampo, nucleo accumbens, area ventrale del tegumento) saranno dissezionate e poste a -80 °C I tessuti verranno analizzati per 1. Analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR di trascritti inerenti agli endocannabinoidi (FAAH, MAGL,CB1R), al sistema dei glucocorticoidi [recettore dei glucocorticoidi (GR), proteine che regolano la localizzazione e/o attivazione del GR (FKBP51,Src1), e agli enzimi responsabili di modificazioni epigenetiche (HDACs, HATs, DNMTs).

Si effettueranno analisi proteomiche mediante Western blots di CB1R, e di proteine responsabili di modificazioni epigenetiche (HDACs, HATs e DNMTs).

Le analisi epigenetiche saranno volte allo studio di: i) attività degli enzimi HATs, HDACs e DNMTs coinvolti nelle modificazioni epigenetiche; ii) studio della metilazione globale del DNA attraverso l'impiego della metodica del "Global DNA methylation assay" oppure la Site-directed methylation assay.

Il progetto valuterà eventi epigenetici responsabili delle alterazioni dell'espressione di diversi geni codificanti per il sistema eCB e di sistemi ad esso correlati nelle aree cerebrali provenienti dagli animali sottoposti ai protocolli comportamentali.

1° Anno: Gli esperimenti analizzeranno al PND35 i livelli dei CB1Rs,e dei GR sia di animali stabulati durante lo svezzamento in condizioni standard, o in comunità' entrambi sottoposti, o no, a stress sociale, per 4 gruppi sperimentali.

2° Anno: Gli esperimenti, verranno ripetuti in animali al PND60 nei 4 gruppi sperimentali analizzando i livelli dei CB1Rs e del GR.

A quel punto si analizzeranno le modificazioni epigenetiche eventuali nelle aree cerebrali in cui si è registrata la modificazione genica.

Statistica

I dati biochimici e molecolari verranno analizzati separatamente per area e attraverso l'utilizzo della Two o Three Way ANOVA. I dati saranno normalizzati come da protocollo classico.

La significatività statistica, fissata a $p < 0.05$, ove appropriato sarà confermata mediante test post-hoc (Newman-Keuls, Tukey, Bonferroni o Dunnett).

Periodo di approfondimento all'estero

Il Docente referente ha da anni intense e fattive collaborazioni, nate nell'ambito di progetti in ambito comunitario e negli Stati Uniti. Attualmente sono in corso collaborazioni con lo Scripps Institute di Jupiter,FL, il Karolinska Institute di Stoccolma e altri, dove i diversi laboratori sono disposti ad ospitare il destinatario dell'assegno per l'opportuno approfondimento, e soprattutto per mettere a punto nuove metodologie sperimentali.

Strategie di realizzazione del Progetto

Verranno utilizzate tecniche di farmacologia e biologia molecolare ed in particolare:

- 1- Estrazione di acidi nucleici.
- 2- Estrazione di proteine nucleari e citoplasmatiche.
- 3- Real Time e TaqMan PCR quantitativa per gli studi di espressione genica.
- 4- Misurazione delle attività enzimatiche HATs e HDACs e DNAMT.
- 5- Analisi di metilazione sito specifica o globale per indagare la presenza di alterazioni epigenetiche a carico del DNA nelle regioni promotore dei geni d'interesse.