

Titolo divulgativo: ‘Mamme sane per figli sani: la salute delle mamme in gravidanza è importante per la salute futura dei figli’

Sottotitolo scientifico: ‘Impatto dell'esposizione perinatale ai pesticidi sulla salute dell'adulto’

Chiara Berteotti

Gruppo di studio:

Giovanna Zoccoli, Alessandro Silvani, Stefano Bastianini, Viviana Carmen Lo Martire, Sara Alvente, Maria Lavinia Bartolucci, Gabriele Matteoli (laboratorio PRISM, Dipartimento di Scienze Biomediche e NeuroMotorie, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna); Roberto Rimondini Giorgini (Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna).

I pesticidi sono sostanze utilizzate per controllare gli organismi considerati nocivi per piante e animali e rappresentano una categoria molto importante di contaminanti alimentari. La categoria più ampia di pesticidi utilizzati in tutto il mondo è rappresentata dagli Organofosfati (OP), nonostante il loro uso nei Paesi europei sia attualmente in diminuzione, e tra questi troviamo il Clorpirifos. Il Clorpirifos è un potente inibitore dell'acetilcolina esterasi ed elevati livelli di tale neurotrasmettitore possono essere rilevati a livello delle sinapsi colinergiche. Residui di Clorpirifos si possono essere rilevare nel latte materno (PMID: 22009134) e nei campioni di sangue del cordone ombelicale (PMID: 15238288). L'esposizione al Clorpirifos durante la gestazione interferisce con lo sviluppo del cervello (PMID: 12642153) interrompendo la replicazione e il differenziamento delle cellule nervose, l'assonogenesi e la sinaptogenesi nelle regioni innervate da proiezioni colinergiche (come i centri respiratori) (PMID: 12417480). Dal momento che l'acetilcolina è un neurotrasmettitore coinvolto nella regolazione respiratoria (PMID 19651660), tale attività può essere influenzata da una disregolazione colinergica in modelli murini.

I fattori di stress che agiscono durante le finestre critiche dello sviluppo possono portare a cambiamenti permanenti nel feto. Questi cambiamenti possono promuovere la sopravvivenza nella prima infanzia predisponendo, allo stesso tempo, l'individuo alla malattia più avanti nel corso della vita (PMID: 23998452). Tali fattori di stress sono di varia natura ed includono malnutrizione e depressione materna, mancanza di cure materne nel periodo post natale, nonché esposizione a sostanze di abuso come oppioidi, etanolo o nicotina (PMID: 23998452; 31491473; 23964195) ed in aggiunta, l'esposizione ai pesticidi. Diversi studi hanno dimostrato l'impatto negativo dello stress perinatale sulla neurogenesi (PMID:19180242), sull'umore (PMID: 25687413), sul metabolismo (PMID: 23964195) e sulla regolazione cardiovascolare (PMID: 21669973; 29224235) nei modelli murini adulti.

Un lavoro recente del gruppo di ricerca PRISM ha indagato la relazione tra stress dovuto ad esposizione perinatale alla nicotina ed ai suoi derivati e alterazioni a lungo termine del sonno nel topo (PMID: 34903845). Sottoponendo madri gravide a concentrazioni di nicotina pari a quelle prodotte dall'esposizione passiva al fumo di sigaretta, si è rilevato che i piccoli, una volta diventati adulti, presentano una riduzione significativa del sonno nel passaggio tra il periodo di riposo e quello di attività, la fase per l'Uomo corrispondente al momento del risveglio mattutino. Le analisi a livello cerebrale hanno inoltre rilevato nell'ippocampo un'alterazione dell'espressione dei recettori per i glucocorticoidi, gli ormoni dello stress. L'ippocampo è la struttura maggiormente sensibile allo stress nella fase di sviluppo del cervello: è infatti una regione molto plastica, che si sviluppa in gran parte dopo la nascita ed è ricca di recettori per i corticosteroidi come i glucocorticoidi. Tale studio ha mostrato da un lato che l'esposizione alla nicotina e ai suoi derivati nelle primissime fasi di vita modifica l'espressione e il bilancio dei recettori dei corticosteroidi nell'ippocampo, e dall'altro che l'espressione nell'ippocampo dei glucocorticoidi è correlata alla riduzione del sonno in età adulta.

L'iperstimolazione colinergica dovuta all'esposizione perinatale al Clorpirifos potrebbe sviluppare lo stesso meccanismo nei topi adulti. L'obiettivo del presente studio è stato analizzare gli effetti dell'esposizione cronica al Clorpirifos durante la gravidanza e l'allattamento in topi di 18 settimane (adulti) figli di madri esposte, sul fenotipo respiratorio durante il sonno. È stato valutato il fenotipo respiratorio durante il sonno utilizzando una tecnica di pletismografia corporea totale.

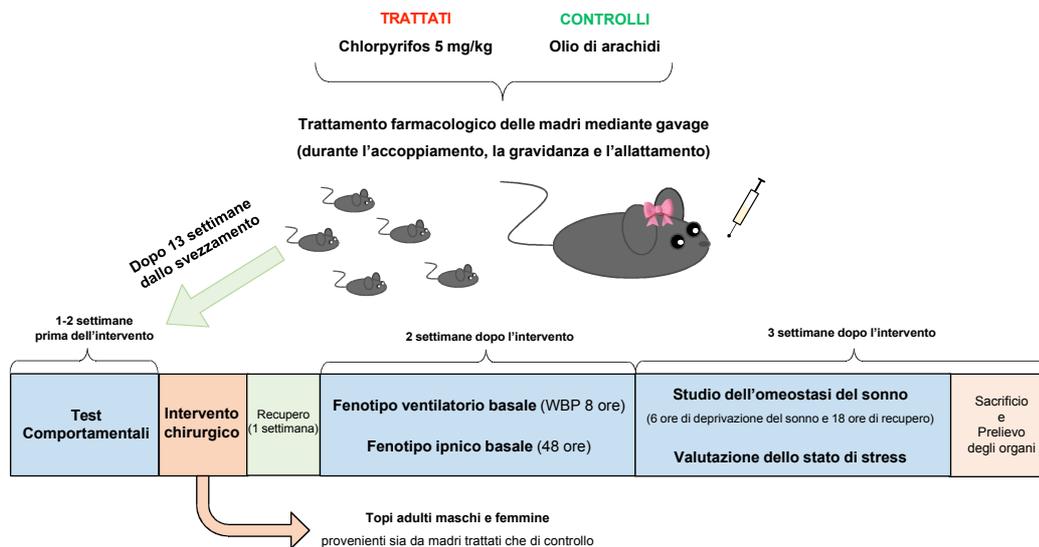
Per indagare l'effetto dell'esposizione al Clorpirifos sulla riprogrammazione a lungo termine del ciclo veglia-sonno, gli animali sono stati inoltre registrati in condizioni fisiologiche e successivamente deprivati di sonno. Questo permetterà di valutare la compromissione dell'omeostasi del sonno durante il successivo periodo di recupero. Infine, considerato che la sovrapproduzione di glucocorticoidi potrebbe anche ridurre la neurogenesi dell'ippocampo, e che la compromissione della neurogenesi dell'ippocampo durante la fase iniziale dello sviluppo può essere associata a deficit cognitivi e disturbi comportamentali negli adulti (compreso il comportamento legato all'ansia), topi esposti al Clorpirifos durante il periodo prenatale sono stati sottoposti a una batteria di test comportamentali prima dell'intervento chirurgico.

Metodi

Approvazione etica

Il protocollo di studio è conforme alla Direttiva UE 2010/63/UE per la sperimentazione animale ed è stato approvato dal Comitato per l'Etica degli esperimenti sugli animali dell'Università di Bologna

(Prot. n. AEDB0.23) e dal Ministero della Salute italiano (Prot. n. 298/2021). Gli esperimenti sono stati condotti secondo le linee guida del comitato per il benessere degli animali dell'Università di Bologna, Italia, e le linee guida ARRIVE. Ogni sforzo è stato fatto per ridurre al minimo la sofferenza degli animali.



Rappresentazione grafica del disegno sperimentale.

Animali e trattamento farmacologico

Il Clorpirifos (5 mg/kg) o il suo veicolo (olio di arachidi) sono stati somministrati alle madri dall'accoppiamento fino allo svezzamento mediante sonda gastrica. I piccoli non sono mai stati trattati con il Clorpirifos.

Protocollo sperimentale

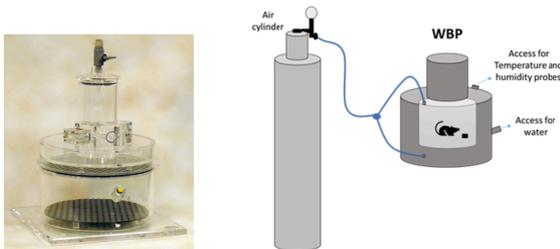
Nel presente esperimento sono stati inclusi topi adulti femmine e maschi nati da madri trattate con Clorpirifos o veicolo.

I topi adulti sono stati sottoposti a intervento chirurgico a 17-18 settimane di età. Ogni topo adulto è stato anestetizzato e trattato con analgesico. I topi sono stati quindi impiantati con elettrodi per ottenere un segnale elettroencefalografico differenziale (EEG) e un segnale elettromiografico differenziale (EMG).

Dopo l'intervento chirurgico, i topi sono stati alloggiati in gabbie singole così da riprendersi dall'intervento per 1 settimana. Quindi, i topi sono stati brevemente anestetizzati per collegare gli

elettrodi a un cavo di registrazione che, a sua volta, è stato collegato a un connettore rotante e un braccio di sospensione del cavo bilanciato che assicura libertà di movimento agli animali.

Le registrazioni simultanee del sonno e dell'attività ventilatoria sono state eseguite all'interno di un pletismografo corporeo per 8 ore, a partire dall'inizio del periodo di luce. La camera pletismografica (WBP) è stata insufflata con aria a $1,5 \text{ litri h}^{-1}$. Il segnale respiratorio è stato derivato dalla pressione differenziale tra la camera in cui veniva alloggiato il topo e una seconda camera di riferimento, misurata con un trasduttore di pressione differenziale ad alta precisione.



Un'immagine e una rappresentazione schematica del pletismografo corporeo totale.

Dopo ulteriori 2-5 giorni di recupero, i topi sono stati sottoposti a un periodo di registrazione di 48 ore del ciclo veglia-sonno indisturbati e liberi di muoversi nella propria gabbia (PMID 24586776; 24950219). Dopo queste registrazioni, i topi sono stati sottoposti a 6 ore di deprivazione di sonno, seguite da 18 ore di recupero. La deprivazione di sonno è stata eseguita con una tecnica di “gentle handling” durante il monitoraggio dei segnali EEG/EMG in tempo reale.

Dopo il recupero del sonno, è stato applicato un protocollo di stress. Tutti i topi sono stati trattenuti in tubi ventilati da 50 ml e lasciati indisturbati in una scatola opacizzata per 2 h (PMID: 24782732). Al termine delle 2 h i topi sono stati sottoposti a eutanasia. Il sangue dall'arteria carotide è stato raccolto e gli ippocampi sono stati sezionati e immediatamente conservati per la successiva espressione genica e analisi di metilazione del DNA.

Acquisizione e analisi dei dati

Tutte le registrazioni sono state eseguite su animali liberi di muoversi alloggiati individualmente nelle loro gabbie. I segnali EEG ed EMG sono stati amplificati e filtrati. Per quanto riguarda il segnale respiratorio, la pressione differenziale, l'umidità e la temperatura della camera sono state continuamente registrate, digitalizzate e memorizzate.

L'acquisizione dei dati è stata eseguita tramite software scritto in Labview 8.0. L'analisi dei dati è stata eseguita con MATLAB R2020a.

La veglia, il sonno senza movimenti oculari (NREM) e il sonno con movimenti oculari rapidi (REM) sono stati valutati sulla base di segnali EEG ed EMG grezzi (epoche di 4-s) utilizzando SCOPRISM, un algoritmo validato (PMID: 25092499).

L'analisi quantitativa della respirazione è stata limitata a episodi di sonno stabile ≥ 12 s a causa del frequente verificarsi di artefatti del movimento durante la veglia (PMID: 26474479; 24950219). I valori del periodo ventilatorio (VP), del volume corrente (VT) e della ventilazione minuto (VM) sono stati ottenuti per ogni stato di sonno (PMID: 28139776).

I valori medi di VP, VT, MV sono stati calcolati per ciascun topo dopo l'esclusione dei respiri con VP e/o VT che hanno deviato più di 3 deviazioni standard dal rispettivo valore medio nell'intera registrazione (PMID: 26474479). Questi calcoli sono stati quindi, in un certo senso schermati dagli effetti dei respiri con valori estremi di VP e/o VT. Infine, le apnee e i respiri aumentati (sighs) sono stati automaticamente rilevati come respiri con valori di VP (apnea) o VT (sighs) più di tre volte i valori medi di VP o VT, rispettivamente, per ogni topo e stato di sonno, e l'accuratezza del rilevamento è stato verificato su registrazioni grezze (PMID: 26474479; 24950219). Poiché i respiri aumentati (sospiri) spesso precedono le apnee durante il sonno NREM, si sono ulteriormente classificate le apnee in sonno NREM come apnee post-sigh se seguivano un sospiro di ≤ 8 s o come apnee spontanee se seguivano un sospiro di > 8 s (PMID: 30920081).

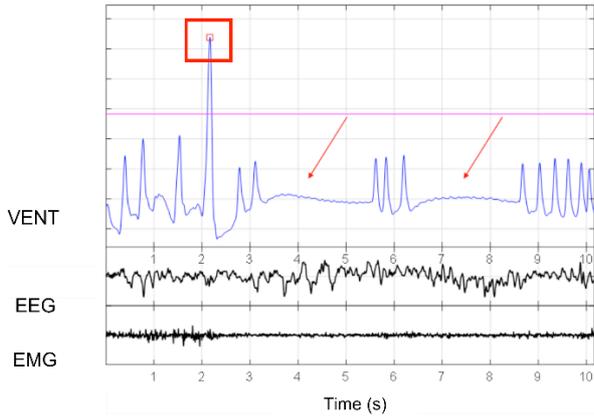
Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con ANOVA tramite software GraphPad Prism sui valori trasformati in logaritmo con sesso e trattamento come fattori. I dati sono mostrati come media \pm SEM. La soglia per la significatività è settata a $P < 0.05$.

Risultati

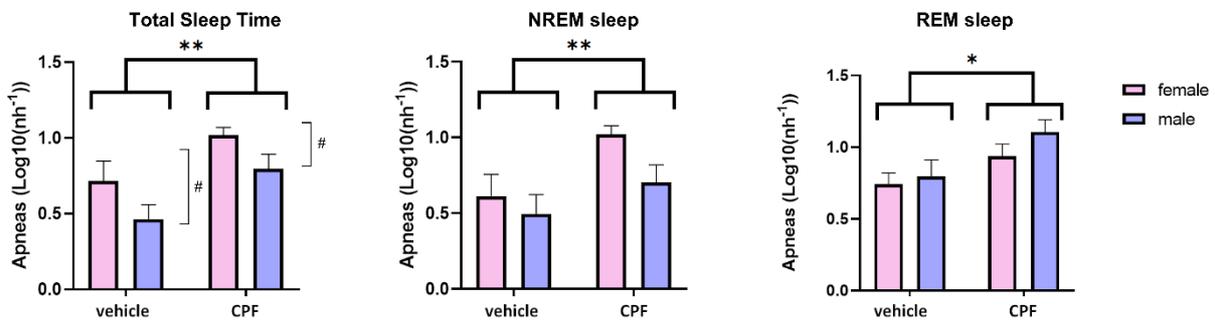
Si riportano i risultati inerenti il fenotipo ventilatorio, con particolare riferimento alla frequenza delle apnee durante il sonno.

In figura si riporta il tracciato grezzo registrato durante una sessione di pletismografia corporea durante un episodio di sonno NREM in un topo femmina nato da madre trattata con Clorpirifos. In particolare, si riportano i segnali ventilatorio (VENT), l'elettroencefalogramma (EEG) e l'elettromiogramma (EMG). Nel riquadro rosso è evidenziato un respiro aumentato (sospiro), mentre le frecce rosse riportano esempi di apnea.



Nei grafici sottostanti sono riportate le frequenze di apnee del sonno in topi femmine (female) e maschi (male) adulti figli di madri trattate con il Clorpirifos (treated) o con il veicolo (control) durante il sonno totale (Total sleep time), il sonno NREM (NREM sleep) e il sonno REM (REM sleep).

* $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ femmine e maschi nati da madri trattate con il Clorpirifos contro femmine e maschi nati da madri trattate con il veicolo; # $P < 0.05$ femmine nate da madri trattate con il Clorpirifos e con il veicolo contro maschi nati da madri trattate con il Clorpirifos e con il veicolo.



Si osserva come la frequenza delle apnee del sonno totale sia significativamente maggiore nei topi adulti nati da madri trattate con il Clorpirifos rispetto a quelli nati da madri trattate con il veicolo. Tale differenza permane anche considerando singolarmente le fasi di sonno NREM e di sonno REM. Inoltre, nel grafico riguardante la frequenza delle apnee del sonno totale, si osserva come le femmine presentino una frequenza di apnee significativamente maggiore dei maschi sia nel gruppo dei figli delle madri trattate con Clorpirifos, sia nel gruppo dei figli delle madri trattate con il veicolo.

Conclusioni e prospettive

L'analisi delle registrazioni condotte in pletismografia corporea ha rivelato un aumento significativo della densità delle apnee nei topi figli di madri trattate con Clorpirifos rispetto a topi figli di madri trattate con il veicolo e questa differenza si osserva anche andando a valutare le sole apnee che si manifestano in sonno NREM e in sonno REM. La rilevanza di questo risultato è legata al fatto che l'esposizione nella prima infanzia al Clorpirifos comporta una riprogrammazione duratura del pattern respiratorio durante il sonno.

L'apnea durante il sonno consiste in episodi ricorrenti di cessazione della respirazione o nella diminuzione del flusso di aria e si associa a risvegli frequenti, frammentazione del sonno e di conseguenza ad eccessiva sonnolenza diurna, rischio aumentato di eventi cardiovascolari avversi, danni metabolici e neurocognitivi. Tale risultato mostra come controllare le condizioni ambientali durante la gravidanza e i primi mesi di vita del bambino sia un fattore cruciale per la salute della madre e per quella della prole, anche nel lungo periodo.