**PROGRAMMA DI RICERCA**

**Richiesta di un assegno di ricerca cofinanziato su Budget Integrato 2021**

**TUTOR: PROF. ALESSANDRO SILVANI**

**DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE**

**Titolo**

**Validazione di un modello murino della sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2**

**Stato dell’arte**

La sindrome di Morvan è una rara e grave sindrome neurologica caratterizzata da segni e sintomi di ipereccitabilità nervosa periferica, quali neuromiotonia, rigidità, crampi muscolari e dolore neuropatico, di disautonomia, quali tachicardia e instabilità della pressione arteriosa, e di encefalopatia, quali marcata insonnia, crisi epilettiche e disturbi neuropsichiatrici come amnesia e disorientamento (Ann Neurol 2012;72:241–5). Anche se la prima descrizione della sindrome di Morvan risale al 1890 (Rev Neurol Paris 2013;169:2-8), solo nel 2001 è stata aperta la strada per la comprensione dei meccanismi della malattia grazie alla scoperta della sua associazione con anticorpi diretti contro il complesso dei canali voltaggio-dipendenti del potassio (complesso VGKC), spesso nel quadro di una sindrome paraneoplastica (Brain 2001;124:2417-26).

La sindrome di Morvan associata ad anticorpi contro il complesso VGKC generalmente colpisce soggetti maschi adulti e risponde all’immunoterapia, sebbene ricadute a lungo termine siano spesso state riportate (Brain 2010;133:2734-48). La terapia immunosoppressiva, inoltre, spesso non permette la guarigione completa dei pazienti, indicando l'esistenza di alterazioni neurologiche persistenti la cui fisiopatologia è ancora incerta. È stato dimostrato che gli anticorpi diretti contro il complesso VGKC espressi dai pazienti con sindrome di Morvan non sono in realtà diretti contro le subunità VGKC vere e proprie, ma contro delle proteine ad esse associate, fra cui Contactin Associated Protein 2 (CASPR2, Brain 2010;133:2734-48).

CASPR2 è una molecola di adesione espressa a livello del sistema nervoso centrale e periferico dove si localizza nella regione juxtaparanodale degli assoni mielinici. Questa proteina media le interazioni tra neuroni e glia durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale ed ha un ruolo fondamentale nel mantenere l’espressione dei canali del potassio Kv1.1 e 1.2 sulla superficie cellulare (J Cell Biol 2003;162:1149-60). Tuttavia, il quadro complessivo delle funzioni di CASPR2 nel sistema nervoso è ancora oscuro. Mutazioni del gene codificante per CASPR2, CNTNAP2, sono state associate ad autismo, epilessia e ritardo mentale (Hum Mol Genet 2012;21:4761-73). Inoltre, anticorpi contro CASPR2 sono stati riportati in campioni di siero prelevati durante la gravidanza in madri di bambini con autismo e ritardo mentale con una frequenza più elevata rispetto a popolazioni di controllo (J Neurol Neurosurg Psychiatry 2017;88:718-21).

In accordo con i postulati di Witebsky, il criterio definitivo per confermare l’origine autoimmune di una patologia è quello di riprodurre la malattia mediante trasferimento passivo in un animale da esperimento dell’anticorpo derivante da un essere umano affetto (Immunol Today 1993;14:426-30). Tuttavia, non vi sono ad oggi modelli animali in cui siano stati riprodotti i segni della sindrome di Morvan associati agli anticorpi anti-CASPR2. Un recentissimo studio ha fornito evidenza a supporto dell’ipotesi di patogenicità degli anticorpi anti-CASPR2, il cui trasferimento passivo a livello periferico per via IP da pazienti a topi ha causato la comparsa di ipersensibilità meccanica correlata ad un aumento dell’eccitabilità dei gangli delle radici dorsali (Neuron 2018;97:806-22). Tuttavia, tale studio non ha indagato i segni delle alterazioni del sistema nervoso centrale e periferico che caratterizzano la sindrome di Morvan, ed in particolare la neuromiotonia e le alterazioni neuropsichiatriche, del ciclo veglia sonno e del sistema nervoso autonomo. È anche possibile che il titolo di anticorpi nel sistema nervoso centrale sia stato limitato in tale studio dalla somministrazione unicamente periferica degli anticorpi. Un altro studio ha dimostrato che il trasferimento passivo di anticorpi anti-CASPR2 umani ai topi per via IP in associazione con lipopolisaccaride (LPS) è in grado di causare alterazioni neuropatologiche e comportamentali (Brain 2019;142:2000-12). Tuttavia, le alterazioni osservate erano minime ed il contributo dell’LPS non escludibile. Inoltre, questo modello ha fallito nel riprodurre il fenotipo classicamente associato ad anticorpi anti CASPR2.

**Obiettivo del progetto**

Sviluppare e validare il primo modello animale della sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2, una grave patologia neurologica la cui fisiopatologia è ancora largamente ignota.

**Sintesi delle attività del progetto**

**Esperimenti in vivo**

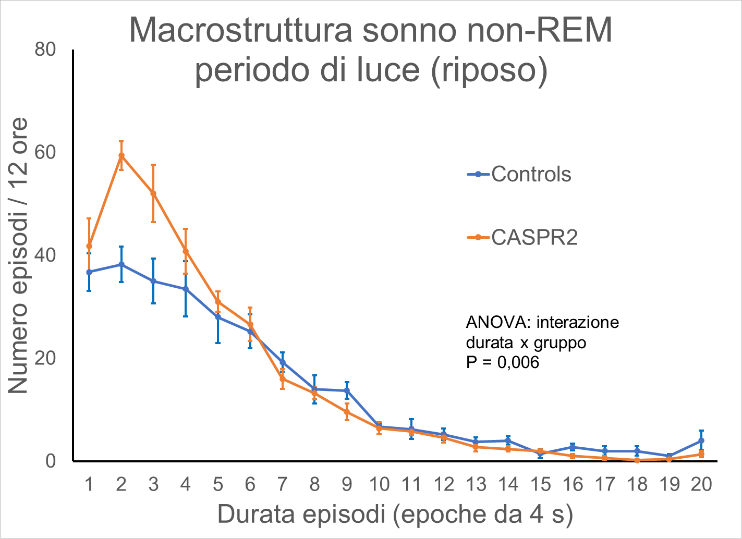
Topi maschi adulti saranno sottoposti ad intervento chirurgico per l’impianto di minielettrodi per la registrazione dei segnali elettroencefalografico (EEG) ed elettromiografico (EMG), atti a permettere una quantificazione del comportamento di veglia e di sonno, assieme ad una cannula in ciascun ventricolo laterale. Ciascuna cannula sarà connessa ad una minipompa osmotica riempita con una soluzione di anticorpi (immunoglobuline G, IgG) purificati dal plasma di uno o l'altro di due pazienti affetti da sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2, oppure di IgG purificate dal plasma di soggetti di controllo non affetti dalla sindrome e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2. Gli anticorpi saranno purificati nel laboratorio di Patologia Neuromuscolare e Neuroimmunologia. Dopo 14 giorni di infusione intracerebroventricolare (ICV) continua, il fenotipo ipnico degli animali sarà caratterizzato nel laboratorio di Fisiologia tramite 48 ore di registrazione dei segnali EEG ed EMG in animali liberi di muoversi. Gli animali saranno quindi sacrificati per ottenere campioni di tessuto nervoso congelati a -80 °C o perfusi e fissati. Lo studio di topi per gli esperimenti in vivo potrà iniziare senza latenza all'inizio della vita del progetto utilizzando anticorpi in eccesso già purificati per gli esperimenti preliminari, come descritto di seguito, e conservati a -80°C. Le procedure di purificazione di ulteriori aliquote di anticorpi procederanno in parallelo ai primi esperimenti in vivo su topi fino al completamento dell'attività sperimentale.

**Esperimenti ex vivo**

Questa attività si svolgerà su campioni di tessuto nervoso congelati o perfusi e fissati, rispettivamente per analisi biomolecolari e istopatologiche. Il legame degli anticorpi anti-CASPR2 al proprio bersaglio verrà dimostrato attraverso l’estrazione mediante acido delle immunoglobuline umane legate al tessuto cerebrale murino. Brevemente, i cervelli congelati di topi infusi con IgG anti-CASPR2 o IgG di controllo verranno omogenizzati, centrifugati e il pellet risospeso in una soluzione acida. Il sopranatante verrà raccolto e la presenza di anticorpi anti-CASPR2 sarà dimostrata mediante specifico cell-based assay (Brain 2019;142:2000-12). I cervelli congelati verranno inoltre utilizzati per valutare l’espressione di CASPR2, Kv1.1 e recettore dell’α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPAR) mediante western blot. I cervelli fissati verranno utilizzati per valutare la presenza di danno neuronale mediante staining con Fluoro-Jade C, oltre che confermare la presenza di alterazioni dell’espressione sinaptica di Kv1.1 e AMPAR mediante staining per questi recettori in associazione con il marker presinaptico Basoon e il marker post-sinaptico postsynaptic density protein 95 (PSD95). La presenza di attivazione microgliale ed astrocitaria verrà valutata mediante immunofluorescenza su tessuto utilizzando anticorpi diretti rispettivamente contro la ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) e contro la glial fibrillary acidic protein (GFAP). Le sezioni verranno osservate al microscopio confocale e le immagini analizzate mediante ImageJ.

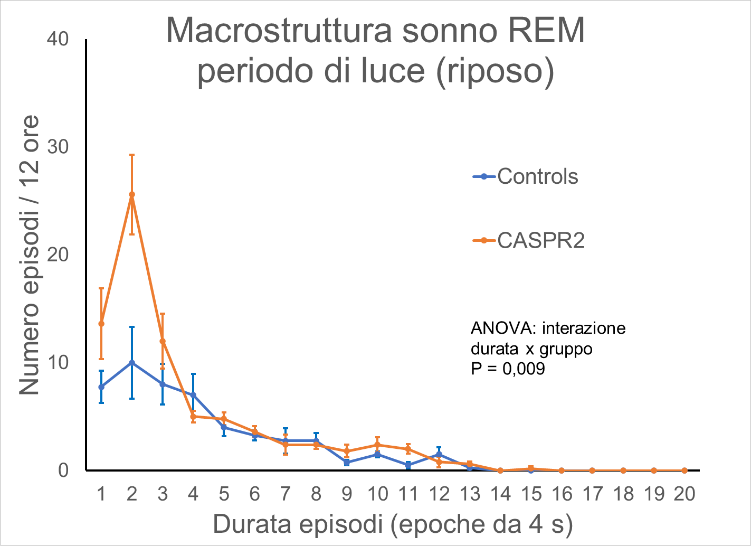
**Risultati preliminari**

L'autorizzazione etica per compiere queste sperimentazioni è già stata ottenuta (aut. n. 380/2019-PR; responsabile scientifico: Prof. Alessandro Silvani). Il gruppo di ricerca del prof. Liguori presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie, che collabora al progetto, ha già provveduto a purificare aliquote di IgG dal plasma di due diversi pazienti affetti dalla sindrome anti-CASPR2 e da soggetti di controllo privi di titolo anticorpale anti-CASPR2. Sono stati compiuti esperimenti pilota su 5 topi con somministrazione di IgG purificate dal plasma di un paziente affetto dalla sindrome anti-CASPR2 e 4 topi con somministrazione di IgG da soggetti di controllo non affetti dalla sindrome e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2. Lo studio pilota ha evidenziato una significativa frammentazione degli episodi di sonno non-REM (Figura 1) e sonno REM (Figura 2) durante il periodo di riposo ed una significativa riduzione della potenza spettrale EEG in banda delta (slow-wave activity, SWA) durante il sonno non-REM, riscontri questi molto promettenti perché compatibili con il quadro clinico osservato nei pazienti affetti dalla sindrome anti-CASPR2.

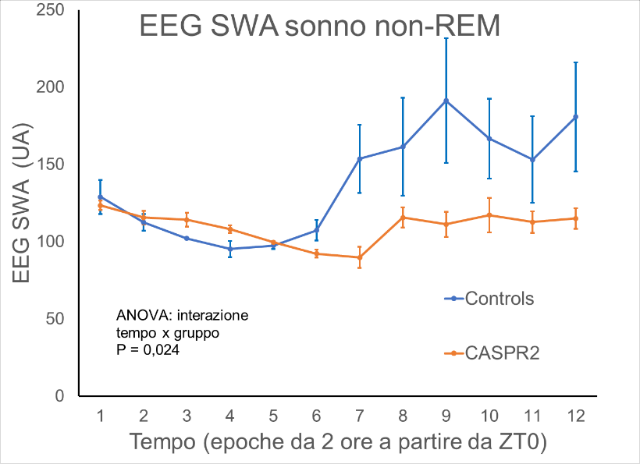


**Figura 1.** Frammentazione del sonno non-REM durante il periodo di luce (riposo) in topi sottoposti a somministrazione ICV di IgG anti-CASPR2 purificate da un paziente affetto dalla sindrome di Morvan o di IgG di controllo (media ± SEM, N = 5 topi con IgG anti-CASPR2 e 4 topi di controllo).

**Figura 2.** Frammentazione del sonno REM durante il periodo di luce (riposo) in topi sottoposti a somministrazione ICV di IgG anti-CASPR2 purificate da un paziente affetto dalla sindrome di Morvan o di IgG di controllo (media ± SEM, N = 5 topi con IgG anti-CASPR2 e 4 topi di controllo).

****

**Figura 3.** Riduzione della potenza spettrale EEG in banda delta (slow-wave activity, SWA) in sonno non-REM durante il periodo di attività (buio) in topi sottoposti a somministrazione ICV di IgG anti-CASPR2 purificate da un paziente affetto dalla sindrome di Morvan o di IgG di controllo (media ± SEM, N = 5 topi con IgG anti-CASPR2 e 4 topi di controllo). ZT: tempo di Zeitgeber (in ore, dall’accensione delle luci; luci accese da ZT0 a ZT12)

****

**Dettaglio delle attività del progetto**

Modelli murini. Gli esperimenti saranno compiuti su topi non mutanti (wild-type) del ceppo inbred C57BL/6J. Tale ceppo è il più studiato nella ricerca biomedica (Jackson laboratories, www.jax.org) e si è dimostrato suscettibile alla sensibilizzazione dei neuroni dei gangli delle radici dorsali in seguito alla somministrazione di anticorpi anti-CASPR2 per via periferica (Neuron 2018;97:806-22). Si studieranno animali adulti di sesso maschile. Questo permetterà di ridurre la variabilità sperimentale a parità di numerosità campionaria e sarà in linea con la maggiore prevalenza della sindrome di Morvan nel sesso maschile (Ann Neurol 2012;72:241–5).

Gli esperimenti proposti includono il sacrificio di tutti gli animali tramite metodica indolore (overdose di anestetico, isoflurano 4% in O2) dopo 2 settimane dall’intervento. La costante sorveglianza degli animali da parte degli operatori e del Servizio per il Benessere animale consentirà di anticipare il sacrificio degli animali qualora si evidenziassero segni precoci di sofferenza, particolarmente nei gruppi sperimentali che riceveranno infusioni di anticorpi anti-CASPR2. Tali aspetti di sofferenza non sono stati comunque mai riscontrati negli esperimenti pilota compiuti.

Stabulazione. I topi saranno stabulati nelle strutture apposite del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM) dell’Università di Bologna. I topi godranno così di un ambiente, di un’alimentazione (dieta 4RF21 Mucedola o similare), di acqua e di cure adeguate alla loro salute e al loro benessere in condizioni di temperatura, luce, ed umidità controllate. In particolare, il valore di riferimento della temperatura ambientale sarà impostato a 23 °C e l’illuminazione si effettuerà con ciclo luce-buio di 12:12 ore. I topi saranno alloggiati con arricchimento ambientale ed in gruppi stabili di individui compatibili. Durante la stabulazione i topi saranno sottoposti ad un controllo quotidiano.

Disegno sperimentale. Saranno studiati 3 gruppi sperimentali:

G1: IgG da paziente 1 affetto da sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2.

G2: IgG da paziente 2 affetto da sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2.

G3: IgG da soggetti di controllo non affetti dalla sindrome e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2.

L’ipotesi di lavoro è di riscontrare differenze significative nella medesima direzione tra i gruppi G1 e G3 e fra i gruppi G2 e G3. Ciò sarebbe indicativo di alterazioni fisiopatologiche indotte dagli anticorpi anti-CASPR2 indipendentemente dal paziente che li produce.

Le procedure sperimentali in vivo sotto descritte verranno eseguite presso il Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM). All’età di 20-30 settimane i topi di tutti i gruppi saranno sottoposti ad intervento chirurgico in anestesia generale ed asepsi con trattamento analgesico e antibiotico intraoperatorio. Si procederà all’impianto di una cannula ICV connessa ad una minipompa osmotica sottocutanea (Alzet, volume 100 microL, velocità di infusione 0,25 microL/ora) per l’infusione continua di IgG purificate da pazienti affetti da sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2 o da soggetti di controllo non affetti dalla sindrome e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2, a seconda del gruppo sperimentale. L’infusione durerà 14 giorni, in dipendenza della durata fissa d’azione della pompa. Nel medesimo intervento si impianteranno anche due coppie di elettrodi per registrazioni di EEG e EMG. Il peso corporeo ed il consumo di cibo dei topi saranno misurati quotidianamente per 3 giorni dopo l’intervento e settimanalmente in seguito fino alla fine dell’esperimento.

Dall’intervento alla fine dell’esperimento, i topi saranno valutati quotidianamente da ricercatori esperti per rilevare la presenza di indicatori HEP accettati di dolore e/o stress (www.humane-endpoints.info/en). Se si rileveranno segni di malessere nella prima settimana dopo l’intervento, si somministrerà una dose addizionale di analgesico analoga a quella somministrata in fase intraoperatoria. Se si rileveranno segni di sofferenza dell’animale (punteggio HEP maggiore o uguale a 15), gli animali saranno sacrificati in modo indolore per perfusione transcardiaca con fissativo (4% paraformaldeide) in condizioni di overdose di anestetico (isoflurano 4% in O2) e l’encefalo sarà quindi analizzato con tecniche immunoistochimiche. Se non si rileveranno segni di sofferenza nei termini delle tabelle HEP, i topi dei diversi gruppi saranno sottoposti a valutazione fenotipica da 10 a 12 giorni dopo l’intervento chirurgico, consistente in 48 ore di registrazioni continue dei segnali EEG ed EMG in animali liberi di muoversi nel loro ambiente di stabulazione abituale.

La valutazione fenotipica avverrà in animali liberi di muoversi e non anestetizzati. L'anestesia modifica infatti il controllo motorio, è palesemente incompatibile con la manifestazione di comportamenti fisiologici di veglia e sonno e con test comportamentali, e costituirebbe un trattamento più stressante delle registrazioni stesse, le quali avverranno in condizioni totalmente fisiologiche. Va rimarcato che la registrazione di EEG e EMG permetterà di determinare lo stato di vigilanza (veglia, sonno NREM, sonno REM) in base a criteri standard (Sleep 2011;34:213-8; J Neurosci Methods 2014;235:277-84) e di riconoscere e caratterizzare eventi epilettici. Gli stati di veglia e sonno costituiscono il principale determinante fisiologico delle modificazioni autonomiche (Clin Exp Pharmacol Physiol 2008;35:987-94). Il monitoraggio continuo della veglia e del sonno contribuirà quindi al controllo del benessere degli animali studiati per tutta la durata delle sessioni di registrazione.

Al termine della valutazione fenotipica (14 giorni dopo l’intervento) metà dei topi di ciascun gruppo, scelti in modo casuale, saranno sacrificati in modo indolore per perfusione transcardiaca con fissativo (4% paraformaldeide) in condizioni di overdose di anestetico (isoflurano 4% in O2) e l’encefalo sarà quindi analizzato con tecniche immunoistochimiche. I restanti topi di ciascun gruppo saranno sacrificati in modo indolore tramite overdose di anestetico (isoflurano 4% in O2) e l’encefalo sarà espiantato e congelato a – 80°C per le successive analisi biomolecolari.

Considerazioni statistiche. Ci si propone di raggiungere una numerosità sperimentale di 10 topi per ciascuno dei 3 gruppi (G1, G2 e G3). Una tale numerosità campionaria conferirebbe una potenza statistica di circa 90% nel rilevare differenze fra gruppi nei valori delle variabili misurate pari o superiori ad 1,5 deviazioni standard. L'obiettivo è realizzabile nei tempi previsti considerando che: a) l'autorizzazione etica per compiere gli esperimenti è già stata ottenuta (aut. n. 380/2019-PR); b) sono già stati purificati anticorpi da due diversi pazienti affetti da sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2 e da soggetti di controllo non affetti dalla sindrome e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2; c) sono già stati compiuti esperimenti pilota su 9 animali; d) l'attrezzatura per la registrazione di biosegnali attualmente disponibile nel laboratorio del Prof. Silvani permette la registrazione simultanea di 3 animali per esperimento. Si studieranno sequenzialmente tutti gli animali disponibili fino al raggiungimento della numerosità sperimentale prevista. In questo modo, si eviteranno arbitrari criteri di inclusione e la produzione immotivata di animali sperimentali. Animali delle medesime nidiate saranno distribuiti fra i tre gruppi in modo omogeneo, garantendo così il miglior compenso possibile di fattori confondenti.

Intervento chirurgico: I topi saranno sottoposti nel laboratorio di Fisiologia ad intervento chirurgico in anestesia generale (isoflurano 1,8-2,4% in O2). Questa modalità di anestesia è efficace e sicura nel topo (Sleep 2011;34:213-8). La temperatura corporea sarà mantenuta tramite tappeto omeotermico e le procedure saranno svolte in asepsi. Il dolore postoperatorio sarà prevenuto grazie alla somministrazione intraoperatoria di analgesico (Carprofene 4 mg/Kg per via subcutanea). Al termine dell’intervento si eseguirà una profilassi antibiotica (12500 U.I./Kg benzilpenicillina benzatinica + 5 mg/Kg diidrostreptomicina solfato, per via subcutanea).

L’intervento chirurgico consisterà nell'impianto di (a) due minipompe osmotiche connesse a due cannule per l’infusione ICV (Brain 2015;138:94-109). In aggiunta, ai topi saranno impiantati anche (Hypertension 2009;53:251-5): (b) due minielettrodi a filo nei muscoli del collo per la registrazione dell’attività EMG posturale; (c) due minielettrodi epidurali per la registrazione dell’attività EEG.

In particolare:

a) Le minipompe osmotiche saranno connesse a due cannule per l’infusione ICV di IgG purificate (Brain 2015; 138: 94-109). Si impiegheranno pompe osmotiche ALZET modello 1002 (Alzet, Cupertino, CA, USA) con le seguenti caratteristiche: lunghezza 1,5 cm; diametro 0,6 cm; peso a secco 0,4 g; volume di riempimento 100 microL; portata di flusso 0,25 microL/ora; durata di infusione 14 giorni. Il giorno (24 ore) prima dell’intervento, le minipompe osmotiche da impiantare saranno riempite con 100 microL di IgG purificate da pazienti affetti da sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2 o da soggetti di controllo non affetti dalla sindrome e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2, a seconda del gruppo sperimentale. La dose di IgG somministrata per via ICV sarà 6 µg/die, ottenuta riempiendo le minipompe con una soluzione di anticorpi con concentrazione 1 mg/mL. Ciascuna minipompa sarà connessa ad un catetere di vinile (C314CT, PlasticsOne, Roanoke, VA, USA; diametro interno 0,28 mm). Durante l’intervento chirurgico, si inserirà una cannula di infusione bilaterale (PlasticsOne, 3280PD-2.0/SP, calibro 28 Gauge, 0,362 mm diametro esterno) nei ventricoli cerebrali laterali (0,6 mm posteriormente e 1 mm lateralmente a bregma, con profondità di 2 mm) impiegando un apparato di posizionamento stereotassico. L’inserimento sarà preceduto dall’esecuzione di fori nella teca cranica nelle posizioni sopra dettagliate tramite un trapano per uso odontoiatrico, avendo cura di non lesionare la dura madre durante l’esecuzione dei fori. Ciascuno dei due rami della cannula sarà connesso ad una delle due minipompe osmotiche, che saranno impiantate in una tasca sottocutanea sul dorso del topo. Si procederà quindi a suturare la cute del dorso e a inglobare la cannula bilaterale nella resina per uso odontoiatrico (Respal, Salmoiraghi Produzione Dentaria, Italia) assieme ai minielettrodi descritti nei due paragrafi seguenti.

b) Ciascuno dei minielettrodi a filo da impiantare nei muscoli nucali per le registrazioni EMG sarà costruito a partire da un segmento di 4 cm di lunghezza di filo di acciaio inossidabile rivestito da Teflon, con calibro di 0,25 mm, prodotto dalla ditta Cooner Wire (Chatsworth, CA, USA). La guaina isolante di Teflon sarà asportata per 0,5 cm al centro e ad un’estremità del segmento per consentire il contatto elettrico tra il minielettrodo e rispettivamente il muscolo ed un connettore di collegamento. I minielettrodi saranno inseriti nei muscoli posteriori nucali tramite un ago chirurgico ricurvo da sutura (calibro 0,61 mm) in modo da mettere in contatto la porzione centrale non isolata del minielettrodo con il ventre muscolare. La fissazione o ancoraggio del minielettrodo al muscolo si effettuerà tramite un doppio nodo piano incrociato. Il nodo sarà mantenuto lasso per non compromettere la perfusione ematica del ventre muscolare (Hypertension 2009;53:251-5). Si avrà l’accorgimento di accertarsi della conduzione elettrica di ciascun minielettrodo tramite un multimetro digitale prima dell’inserimento. Per verificare la funzionalità dei minielettrodi impiantati si valuteranno le caratteristiche dei segnali biologici ad alta amplificazione registrati tramite i minielettrodi stessi.

c) I due minielettrodi epidurali (derivazione differenziale fronto-parietale) per la registrazione dell’attività EEG saranno posizionati 2 mm anteriormente e 2 mm lateralmente al bregma (frontale) e 2 mm anteriormente e 2 mm lateralmente al lambda (parietale). Per l'inserimento dei minielettrodi si sezionerà e si divaricherà la cute del cranio e si asporterà quindi il periostio tramite una delicata abrasione. Si eseguiranno fori nella teca cranica nelle posizioni sopra dettagliate tramite un trapano per uso odontoiatrico, avendo cura di non lesionare la dura madre, sulla quale i minielettrodi saranno delicatamente appoggiati (Hypertension 2009;53:251-5). I minielettrodi saranno costruiti in acciaio inossidabile, con lunghezza 4,9 mm e calibro 1,4 mm. Ciascun minielettrodo sarà verificato elettricamente tramite multimetro digitale prima dell’impianto; la verifica dei minielettrodi impiantati sarà effettuata analizzando i segnali biologici ad alta amplificazione registrati tramite i minielettrodi stessi. Per garantire il fissaggio o ancoraggio dei minielettrodi, ciascun minielettrodo sarà reso solidale alla teca cranica utilizzando cemento per uso odontoiatrico (Relyx Unicem 2 Clicker 3M ESPE, Henry Shein Krugg Italia). A ciò si aggiungeranno 2 miniviti di ancoraggio in acciaio inossidabile (00-96x3/32, Plastics One). I minielettrodi e le miniviti saranno quindi inglobati nella protezione in resina per uso odontoiatrico (Respal, Salmoiraghi Produzione Dentaria, Italia) assieme alle cannule ICV sopra descritte.

Il potenziale dolorifico di ciascuna di queste procedure chirurgiche è stimato da lieve a moderato sulla base delle linee guide ACLAM (American College of Laboratory Animal Medicine, www.aclam.org). Tuttavia, il potenziale dolorifico intraoperatorio sarà annullato grazie all’anestesia generale profonda ed al trattamento analgesico. Dopo l’intervento gli animali saranno posti sotto stretta osservazione, anche con l’ausilio dei Medici Veterinari del Servizio Veterinario Centralizzato, e si provvederà alla compilazione delle apposite tabelle degli Humane End Points (HEP). La velocità di infusione delle IgG (totale 0,5 microL/ora, tramite due pompe in parallelo con flusso di 0.25 microL/ora ciascuna) sarà trascurabile rispetto a quella fisiologica di produzione del liquido cefalorachidiano nel topo (22,2 microL/ora), determinando così aumenti trascurabili della pressione intracranica (FASEB J. 2005;19:76-8). Alla luce del D.L.vo 26/2014, queste procedure possono dunque essere considerate di entità moderata. Grazie alle precauzioni adottate, la sofferenza attesa in seguito a queste procedure sarà nessuna o poca.

Dopo l’intervento chirurgico, i topi saranno stabulati singolarmente per tutta la durata residua dell’esperimento (2 settimane) per prevenire lesioni causate dai conspecifici in presenza degli impianti chirurgici. Durante questo periodo si manterrà tuttavia il contatto visivo ed olfattivo con conspecifici per attenuare gli effetti dell’isolamento. Alla luce del D.L.vo 26/2014, questa procedura può dunque essere considerate di entità lieve.

Preparazione delle IgG purificate per infusione ICV. Le IgG saranno purificate nel laboratorio di Patologia Neuromuscolare e Neuroimmunologia del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie sotto la supervisione del Prof. R. Liguori, che coordina il gruppo di ricercatori che ha scoperto la relazione tra sindrome di Morvan e gli anticorpi anti-VGKC, che includono quelli anti-CASPR2 (Brain 2001;124:2417-26). Le IgG totali saranno purificate dal plasma di pazienti affetti dalla sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2 e da soggetti di controllo non affetti dalla sindrome di Morvan e privi di titolo anticorpale anti-CASPR2. Si impiegheranno colonne con biglie di Sepharose associate a proteine G (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In particolare, il plasma sarà diluito 1:4 con soluzione di Hartmann e passato in colonne con biglie di Sepharose con un flusso di 0.5 mL/min. Ulteriore soluzione di Hartmann si impiegherà per lavare poi le biglie assicurando l’assenza di aspecifici. Le IgG saranno eluite con una soluzione di glicina 0.1 M (pH 2.3) e neutralizzate immediatamente con Tris 1 M (pH 8). Le IgG purificate saranno certificate come prive di patogeni trasmissibili all’uomo.

Registrazioni continue dei segnali EEG e EMG. Queste registrazioni avverranno per 48 ore da 10 a 12 giorni dopo l’intervento nel laboratorio di Fisiologia seguendo un protocollo già pubblicato (Sleep 2011;34:213-8), con aggiunta di registrazioni video. Le registrazioni saranno effettuate con temperatura ambientale impostata a 23 °C, la temperatura di stabulazione a cui i topi sono acclimatati, e che è perfettamente compatibile col loro benessere (PLOS One 2012;7:e47032). Il ciclo luce-buio sarà di 12:12 ore, uguale a quello di stabulazione. L’apparato utilizzato per la registrazione consisterà in una batteria di amplificatori modello 7P511J (Grass-Telefactor, AstroMed, Inc., USA) e un sistema di acquisizione dati sviluppato nel laboratorio con scheda PCI-6224 e componentistica National Instruments (Austin, TX, USA) e ambiente software di programmazione Labview (National Instruments). La trasmissione dei segnali dagli elettrodi all’apparato di registrazione avverrà utilizzando cavi sottili e connettori elettrici rotanti, in grado di evitare la compromissione del movimento spontaneo dei topi. La procedura di registrazione mediante cavi per l’acquisizione dei segnali EEG ed EMG nel topo rappresenta la tecnica allo stato dell’arte (gold standard), utilizzata nei principali laboratori del sonno a livello internazionale. Questa procedura di registrazione può essere considerata di lieve entità alla luce del D.L.vo 26/2014. La discriminazione degli stati di veglia e sonno sulla base dei segnali EEG/EMG sarà effettuata in base a criteri standard (Sleep 2011;34:213-8; J Neurosci Methods 2014;235:277-84). Questa discriminazione fornirà informazioni specifiche sul ritmo nictemerale della veglia, del sonno NREM e del sonno REM e delle eventuali sue alterazioni.

Analisi dei dati. L'attività consisterà nell'analisi delle registrazioni EEG ed EMG per determinare gli stati del ciclo veglia sonno (veglia, sonno non-REM, sonno REM) con una risoluzione temporale di 4 s. La procedura sarà compiuta in modalità semiautomatica, impiegando dapprima un algoritmo per la determinazione automatica degli stati di sonno precedentemente validato nell'ambito di una collaborazione internazionale (J Neurosci Methods 2014;235:277-84). I risultati ottenuti tramite l'algoritmo automatico saranno poi verificati da operatori esperti sulla base dei tracciati grezzi EEG e EMG (Hypertension 2009;53:251-5). La determinazione degli stati di veglia e di sonno sarà la base per l'analisi della macrostruttura del sonno, compiuta determinando il numero di episodi spontanei di veglia e di sonno, la distribuzione della durata di tali episodi e la latenza del sonno nelle 24 ore e separatamente durante il periodo di luce (riposo) e quello di buio (attività) (PLoS One 2015;10(10):e0140520). Si procederà inoltre all'analisi spettrale del segnale EEG in ciascuno stato di veglia e di sonno, un indicatore preciso della qualità della veglia e del sonno (Sleep 2011;34:213-8). Si procederà infine all'analisi dell'attività EMG in ciascuno stato di veglia e sonno applicando la tecnica delle distribuzioni normalizzate dei valori EMG (DNE), recentemente sviluppata de validata al Prof. Silvani nell'ambito di una collaborazione internazionale (Sleep. 2017;40(4). doi: 10.1093/sleep/zsx029) per verificare l'esistenza di alterazioni del controllo motorio durante il sonno. Tutte le analisi dei dati neurofisiologici saranno compiute usando software scritto nel laboratorio in ambiente Matlab.

Parallelamente, si procederà all'analisi dei risultati di biologia molecolare e istopatologia ottenuti tramite esperimenti ex vivo su tessuto nervoso espiantato post-mortem dai topi studiati. In particolare, l'analisi consisterà in primo luogo nella dimostrazione del legame degli anticorpi anti-CASPR2 al proprio target mediante estrazione con acido delle immunoglobuline umane legate al tessuto cerebrale murino. I cervelli congelati verranno inoltre utilizzati per investigare i meccanismi con cui gli anticorpi anti-CASPR2 causano i loro effetti clinici. In particolare, studi in vitro hanno dimostrato che tali anticorpi causano l’internalizzazione di CASPR2, alterandone la capacità di ancoraggio al canale del potassio e riducendone quindi l’espressione (Neuron 2018;97:806-22; Brain 2019;142:2000-12). Questo, a sua volta, potrebbe determinare una dispersione dei recettori per AMPA (AMPAR). Verrà pertanto valutata l’espressione di CASPR2, Kv1.1 e AMPAR mediante western blot. L’espressione di Kv1.1 e AMPAR e la loro corretta localizzazione sinaptica verranno inoltre studiati mediante immunoistochimica sui cervelli fissati. Dato il riscontro di perdita neuronale, astrocitosi e attivazione microgliale in precedenti studi autoptici su pazienti deceduti a seguito di sindrome di Morvan (Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation 2015;2:e75; J Neurol Sci 2017;372:453–5), i cervelli fissati verranno utilizzati per valutare la presenza di danno neuronale conseguente all’attivazione microgliale ed astrocitaria. Le analisi delle immagini verrà eseguita mediante ImageJ come precedentemente descritto (Brain 2019;142:2000-12).

**PROGRAMMA DI FORMAZIONE DELL’ASSEGNISTA**

**Richiesta di un assegno di ricerca cofinanziato su Budget Integrato 2021**

**TUTOR: PROF. ALESSANDRO SILVANI**

**DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE**

**Titolo**

**Validazione di un modello murino della sindrome di Morvan associata ad anticorpi anti-CASPR2**

**Piano di attività e formazione dell’Assegnista**

Il o la titolare dell’assegno collaborerà alle seguenti attività: gestione della colonia di topi; costruzione di elettrodi; attività microchirurgica di impianto di elettrodi, cannule e pompe osmotiche; registrazione di variabili fisiologiche in topi liberi di muoversi; discriminazione degli stati di veglia e sonno in base all’analisi visiva dei tracciati polisonnografici; analisi biomolecolari e istopatologiche del tessuto nervoso; analisi matematica e statistica ed interpretazione dei risultati ottenuti.

Il presente programma di ricerca si avvarrà di tecniche già messe a punto nel laboratorio del proponente. La colonia murina necessaria è già disponibile al laboratorio. Dati preliminari sono già stati ottenuti e illustrati in sintesi nella proposta di progetto allegata. Ci si attende quindi che durante il periodo (1 anno) dell’assegno di ricerca, il/la titolare ottenga quindi dati conclusivi sull’obiettivo proposto.

Il laboratorio del proponente è in grado di fornire al/alla titolare dell’assegno una formazione completa e personalizzata, con una parte teorica comprendente la fisiologia del ciclo veglia-sonno, l’utilizzazione di modelli murini di patologia umane, e le nozioni di elettroencefalografia e biologia del sistema nervoso.

Il piano di attività e formazione potrà essere specificamente finalizzato all’acquisizione da parte del/della titolare di: competenze pratiche quali la capacità di effettuare autonomamente l’intervento chirurgico per l’impianto di elettrodi, cannule e pompe osmotiche nel topo e le registrazioni di segnali elettroencefalografici ed elettromiografici; la capacità di effettuare l’analisi matematica e statistica dei dati ottenuti con programmi SPSS e Matlab.

Il/la titolare parteciperà 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 e a riunioni periodiche di raccordo con il gruppo di ricerca del prof. Liguori, che collabora al progetto. Sono inoltre previsti incontri mensili di approfondimento degli aspetti teorici del lavoro programmato. Al termine dell’attività il/la titolare terrà un seminario per l’esposizione dei risultati conseguiti. Il/La titolare parteciperà inoltre a congressi nazionali ed internazionali sul sonno e le neuroscienze (ad es., Società Italiana di Fisiologia, Società Italiana di Neuroscienze, Società Italiana di Neurologia, Associazione Italiana di Medicina del Sonno, European Sleep Research Society, Federation of European Neuroscience Societies).