

Effetti del torpore sintetico sull'espressione genica valutata tramite RNAseq

Stato dell'arte

L'ibernazione è un lungo periodo di animazione sospesa costituito da una sequenza di episodi di torpore, nel quale mammiferi come l'orso, il ghio, lo scoiattolo o il pipistrello sono in grado di entrare. Durante questi episodi, il metabolismo viene attivamente ridotto (del 95% in alcune specie) e l'organismo va incontro ad un drastico adattamento. In questa condizione infatti, tutti gli organi e apparati vanno incontro ad importanti adattamenti nella loro fisiologia, che possono rappresentare un'opportunità di intervento per il trattamento di molte patologie (Cerri, 2017).

I meccanismi che inducono il torpore in natura non sono al momento noti, e due teorie si sono confrontate nel corso del tempo: 1) l'idea che a determinare la soppressione metabolica sia un ormone circolante; 2) l'idea che sia il cervello ad attivare l'ingresso in torpore. Della prima ipotesi non sono mai state trovate prove a supporto convincenti, mentre la seconda ha trovato alcune importanti conferme sperimentali (Takahashi et al., 2020; Hitrec et al., 2019).

Sulla base di questa seconda ipotesi, abbiamo mostrato come sia possibile indurre uno stato simile al torpore - chiamato successivamente torpore sintetico (Cerri, 2017) - in un animale - *Rattus norvegicus* - che non è in grado di entrare in torpore in natura (Cerri et al., 2013). Questo esperimento è poi stato seguito da altri, che hanno descritto altre procedure possibilmente efficaci (Takahashi et al., 2020; Tupone et al., 2013; Zakharova et al., 2019).

Espressione genica durante il torpore

Diversi esperimenti hanno valutato come si modifichi l'espressione genica durante il torpore e l'ibernazione (Gillen et al., 2021; Sun et al., 2020). In generale, l'attività di trascrizione e traduzione è rallentata in proporzione alla riduzione della temperatura corporea, ma diversi adattamenti specifici suggeriscono che il genoma vada incontro ad una modificazione plastica mirata al mantenimento delle funzioni di base per la difesa e la sopravvivenza della cellula.

A differenza di quanto si conosce relativamente all'espressione genica durante l'ibernazione, non si conosce invece molto relativamente al torpore sintetico. Essendo infatti quest'ultimo stato indotto in animali non-ibernanti, è possibile che l'adattamento cellulare alle condizioni di profonda ipotermia possa presentare caratteristiche diverse.

Scopo del progetto

Valutare come il torpore sintetico modifichi l'espressione genica.

Procedure sperimentali

Verrà utilizzato il protocollo di induzione del torpore sintetico nel ratto, già ampiamente validato nel nostro laboratorio (Cerri et al., 2013) che consiste nel blocco farmacologico della struttura del tronco encefalico Raphe Pallidus, sede di premotoneuroni che controllano gli effettori termogenici, causando la sospensione della risposta termoregolatoria.

Per tutti gli esperimenti, gli animali verranno sottoposti ad intervento chirurgico in anestesia generale per l'impianto di una microcannula nel Raphe Pallidus ed un sensore di temperatura telemetrico intraperitoneale (Anipill, Bodycap). Dopo una settimana di recupero, gli animali verranno indotti in torpore sintetico mediante ripetute microiniezioni di un agonista GABAA-ergico nel Raphe Pallidus (Gruppo TS) oppure in uno stato ipotermico forzato indotto da anestesia associata a raffreddamento generalizzato (Gruppi IF), o ancora mantenuti in stato di eutermia (gruppi di controllo, C). Dopo 4-6 ore gli animali verranno sacrificati e ne verranno dissezionati gli organi, per la valutazione dell'espressione genica tramite RNAseq.

Piano Sperimentale

Valutare l'espressione genica in diversi organi dopo induzione di uno stato ipotermico (torpore sintetico o ipotermia forzata).

1. Gruppo C (n=8) - eutermia
2. Gruppo TS (n=8) - torpore sintetico
3. Gruppo IF (n=8) - ipotermia forzata

PROGRAMMA DI ATTIVITA' DELL'ASSEGNISTA

L'attività dell'assegnista consisterà in:

- i. Microchirurgia nel ratto, in particolare:
 - Microchirurgia cranio-encefalica per la somministrazione di sostanze a livello nervoso centrale
 - Impianto di sensori telemetrici per la rilevazione della temperatura corporea
- ii. Estrazione degli organi
- iii. Acquisizione ed Analisi dei dati provenienti da RNAseq

Il tutor ha comprovata esperienza nei metodi sovrामenzionati (Cerri et al., 2013, Tinganelli et al., 2019). L'assegnista lavorerà interagendo strettamente con il tutor, che istruirà l'assegnista allo svolgimento e analisi di tutti gli esperimenti proposti. L'assegnista inoltre parteciperà a periodiche riunioni in cui verrà invitato a presentare lo stato di progresso della propria attività, al fine di migliorarne le capacità comunicative.

Una singola persona può svolgere 4 esperimenti al mese. Per tutti gli esperimenti, considerato anche un tasso di imprevisti del 10%, sono necessari 27 animali. Per l'estrazione del RNA e il deep sequencing ci si avvarrà di un servizio esterno. Per le analisi sono previsti 4 mesi di lavoro. Le attività previste da questo progetto sono eseguibili in 12 mesi lavorativi in totale.

Tabella 1

| Numero animali | Stima dei mesi di lavoro (inclusi imprevisti) |
|--|--|
| 3 gruppi, 8 ratti/gruppo 24 ratti (+10% per imprevisti) | 7 (+4 elaborazione dati) |

Bibliografia

Cerri, M. The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications. *Annu. Rev. Physiol.* 2017, 79, 167–186.

Cerri, M.; Mastrotto, M.; Tupone, D.; Martelli, D.; Luppi, M.; Perez, E.; Zamboni, G.; Amici, R. The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defense induces a suspended animation state in the rat. *J. Neurosci.* 2013, 33, 2984–2993.

Gillen AE, Fu R, Riemondy KA, Jager J, Fang B, Lazar MA, Martin SL. Liver Transcriptome Dynamics During Hibernation Are Shaped by a Shifting Balance Between Transcription and RNA Stability. *Front Physiol.* 2021 May 21;12:662132.

Hitrec, T., Luppi, M., Bastianini, S., Squarcio, F., Berteotti, C., Lo Martire, V., Martelli, D., Occhinegro, A., Tupone, D., Zoccoli, G., Amici, R., Cerri, M., 2019. Neural control of fasting-induced torpor in mice. *Sci. Rep.* 9, 15462. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51841-2>

Sun H, Wang J, Xing Y, Pan YH, Mao X. Gut transcriptomic changes during hibernation in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Front Zool.* 2020 Jul 17;17:21.

Takahashi, T.M., Sunagawa, G.A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., Sakurai, T., 2020. A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature* 583, 109–114. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2163-6>

Tinganelli W, Hitrec T, Romani F, Simoniello P, Squarcio F, Stanzani A, Piscitiello E, Marchesano V, Luppi M, Sioli M, Helm A, Compagnone G, Morganti AG, Amici R, Negrini M, Zoccoli A, Durante M, Cerri M. Hibernation and Radioprotection: Gene Expression in the Liver and Testicle of Rats Irradiated under Synthetic Torpor. *Int J Mol Sci.* 2019, 20(2).

Tupone, D., Madden, C.J., Morrison, S.F., 2013. Central activation of the A1 adenosine receptor (A1AR) induces a hypothermic, torpor-like state in the rat. *J. Neurosci.* 33, 14512–14525. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1980-13.2013>

Zakharova, N.M., Tarahovsky, Y.S., Fadeeva, I.S., Komelina, N.P., Khrenov, M.O., Glushkova, O. V., Prokhorov, D.A., Kutysenko, V.P., Kovtun, A.L., 2019. A pharmacological composition for induction of a reversible torpor-like state and hypothermia in rats. *Life Sci.* 219, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.01.023>