**Richiesta di un assegno di ricerca**

**TUTOR: Davide Martelli**

**Valutazione fisiopatologica del prolungamento dello stato di torpore sintetico nel ratto.**

|  |
| --- |
| **Allegato 1: PROGETTO DI RICERCA**  In risposta a condizioni ambientali sfavorevoli, alcuni animali mettono in atto un meccanismo di difesa considerato uno degli esempi più estremi di plasticità a livello fenotipico: il torpore. Questa strategia biologica è caratterizzata da una riduzione del metabolismo corporeo che permette di poter tollerare una temperatura corporea simile a quella ambientale attraverso il mantenimento di uno stato ipotermico regolato. Durante il fenomeno ci sono sostanziali modificazioni di natura metabolica, molecolare e neuroendocrina che vengono adottate a scopo protettivo dall’animale (Carey et al., 2003). In particolare, si evidenzia un notevole aumento della resistenza alle radiazioni (Kuskin et al., 1959; Baird et al., 2011), caratteristica che sarebbe estremamente utile replicare negli animali non-ibernanti per le potenziali ricadute sia in ambito medico, per esempio per proteggere il tessuto circostante quello tumorale durante la radioterapia, sia in ambito tecnologico, fornendo un modello di radioprotezione efficace per gli astronauti coinvolti in progetti di viaggi interplanetari di lunga durata (Cerri et al., 2016, Cerri, 2017).  Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato come sia possibile indurre uno stato di ipotermia profonda totalmente reversibile (torpore sintetico, TS (Cerri, 2017) in animali non ibernanti sospendendo il controllo termoregolatorio per mezzo dell’inibizione farmacologica dei neuroni localizzati nel Raphe Pallidus (RPa), un’area chiave nel controllo della termogenesi (Cerri et al., 2013). I parametri fisiologici misurati in questo modello subiscono dei cambiamenti che sono simili a quelli osservati in animali naturalmente ibernanti, come la diminuzione dei valori della temperatura cerebrale che raggiunge valori prossimi a quella ambientale e un abbassamento della frequenza cardiaca e respiratoria (Cerri et al., 2013).  Questa condizione è stata per ora mantenuto per un tempo limitato (6h). Nell’esperimento descritto in Cerri et al., 2013 non vi sono motivi fisiologici che indichino che lo stato di torpore sintetico non possa essere prolungato per un tempo superiore. Poter mantenere l’organismo in una condizione ipometabolica/ipotermica come il torpore sintetico per durate prolungate ne estenderebbe l’applicabilità ad altri settori della medicina e dell’esplorazione spaziale.  Il progetto qui proposto si propone di esplorare un metodo potenzialmente efficace nel prolungare il torpore sintetico in un animale non ibernante come il ratto, facendo uso di una tecnica nota come chemogenetica, che consentirà di indurre il torpore sintetico tramite un farmaco somministrato per via sistemica, e non direttamente nel parenchima cerebrale. Lo scopo è valutare se sia possibile prolungare la durata di un episodio di torpore sintetico fino a 7 giorni; valutare la risposta fisiologica dell'animale al fine di pianificare eventuali interventi di sostegno delle funzioni vitali; e valutare gli effetti del torpore sintetico prolungato sui parametri ematochimici e sugli organi.  **Procedure sperimentali**  Il protocollo sperimentale prevede una procedura chirurgica per la somministrazione di un vettore virale adenoassociato (disponibile commercialmente) il quale porta al proprio interno il costrutto per la sintesi neuronale della proteina canale inibitoria hM4Di, attivata specificamente da una sola molecola esogena, la Clozapina N-Oxide (CNO), che non agisce su nessun recettore endogeno (tecnica chemogenetica basata sull’utilizzo di DREADD - Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), attraverso una nanoinezione stereotassica nel Raphe Pallidus. Si procederà inoltre all’impianto di elettrodi per la registrazione dell’elettromiogramma nucale, elettroencefalogramma, attività diaframmatica; e verrà introdotto un sensore telemetrico nell’arteria femorale per la rilevazione della pressione arteriosa. Dopo tre settimane di recupero post-chirurgico, nelle quali si raggiunge un adeguato livello di espressione virale, verrà indotto uno stato di TS attraverso la somministrazione di CNO, e verrà successivamente mantenuto per 48, 96 ore o 7 giorni (all’occorrenza ripetendo la somministrazione di CNO).  **Esperimento**  Valutare la possibilità di prolungare in modo sicuro il periodo di TS attraverso la manipolazione chemogenetica del Raphe Pallidus.  **Gruppo 1 (n=20)** - valutare il benessere dell’animale dopo un periodo di TS di 48 h. Al termine delle 48h, un primo sottogruppo di animali (n=10) verrà sacrificato al termine delle 48h, per valutare gli eventuali effetti precoci sullo stato di salute, mentre al secondo sottogruppo (n=10) sarà permesso di recuperare per un massimo di sette giorni, al termine dei quali verranno sacrificati per valutare gli effetti tardivi sullo stato di salute. Per tutti i sottogruppi sperimentali si procederà ad usare due diverse metodiche di sacrificio, poiché sarà differente per il tipo di analisi che verranno effettuate: ematochimiche, anatomo-patologiche, immunoistochimiche e molecolari, in aggiunta alle variabili fisiologiche.  **Gruppo 2 (n=20)** - valutare il benessere dell’animale dopo un periodo di TS di 96 h. Gli animali verranno sottoposti allo stesso protocollo previsto per il gruppo 1, ad eccezione della durata del TS, che sarà di 96h.  **Gruppo 3 (n=20)** - valutare il benessere dell’animale dopo un periodo di TS di 7 giorni. Gli animali verranno sottoposti allo stesso protocollo previsto per il gruppo 1, ad eccezione della durata del TS, che sarà di 7 giorni.  **Bibliografia**  Baird BJ, Dickey JS, Nakamura AJ, Redon CE, Parekh P, Griko YV, Aziz K, Georgakilas AG, Bonner WM, Martin OA (2011) Hypothermia postpones DNA damage repair in irradiated cells and protects against cell killing. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 711(1–2), 142–149.  Carey HV, Andrews MT, Martin SL. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. Physiol Rev. 2003 Oct;83(4):1153-81.  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 Feb 13;33(7):2984-93.  Cerri M, Tinganelli W, Negrini M, Helm A, Scifoni E, Tommasino F, Sioli M, Zoccoli A , Durante M.(2016) Hibernation for space travel: Impact on radioprotection. Life Sciences in Space Research. 11, 1–9.  Cerri M. The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications.Annu Rev Physiol. 2017 Feb 10;79:167-186. |

Kuskin SM, Wang SC, Rugh R. (1959) Protective effect of artificially induced hibernation against lethal doses of whole body x-irradiation in CF male mice. The American journal of physiology. 196(6), 1211–3.

## **Allegato 2: PROGRAMMA DI ATTIVITA’ DELL’ASSEGNISTA**

**L’attività dell’assegnista consisterà in:**

1. Microchirurgia nel ratto, in particolare:

* Microchirurgia del cranio per la somministrazione di sostanze a livello centrale
* Impianto di sensori telemetrici per la rilevazione della pressione arteriosa, impianto di elettrodi per la rilevazione di elettromiogramma nucale e diaframmatico, elettroencefalogramma.

1. Prelievo di sangue arterioso e venoso, estrazione degli organi, utilizzo di tecniche immunoistochimiche e biomolecolari per la valutazione citopatologica dei tessuti.
2. Acquisizione ed analisi statistica dei dati

Il tutor ha comprovata esperienza nei metodi sovramenzionati (Cerri et al., 2013; Martelli et al., 2014; Komegae et al., 2018). 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 8 esperimenti al mese. Per tutti gli esperimenti, considerato anche un tasso di imprevisti del 10%, sono necessari 66 animali. Per le analisi immunoistochimiche e biomolecolari sono previsti 3 mesi di lavoro, mentre l’analisi dei dati e l’elaborazione statistica prevedono un mese 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,  20 ratti/gruppo  60 ratti (+10% per imprevisti) | 8 (+3 analisi immunoistochimiche e biomolecolari, +1 elaborazione dati) |

**Bibliografia**

Cerri, M., Zamboni, G., Tupone, D., Dentico, D., Luppi, M., Martelli, D., Perez, E., Amici, R. (2010) Cutaneous vasodilation elicited by disinhibition of the caudal portion of the rostral ventromedial medulla of the free-behaving rat. Neuroscience. 165(3), 984–995.

Komegae, E.N., Farmer, D.G.S., Brooks, V.L., McKinley, M.J., McAllen, R.M., Martelli, D. (2018) Vagal afferent activation suppresses systemic inflammation via the splanchnic anti-inflammatory pathway. Brain, Behavior, and Immunity. 73, 441–449.

Martelli, D., Yao, S.T., McKinley, M.J., McAllen, R.M. (2014) Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. The Journal of Physiology. 592(7), 1677–1686.