***BUDGET INTEGRATO 2022 –SCHEDA RICHIESTA ASSEGNO COFINANZIATO***

Il richiedente **prof. Alessandro Silvani**

valutazione VRA 2019: ***□*** *NO X SI*

*I richiedenti che sono stati sottoposti a VRA 2019 dovranno inserire MAX 4 PUBBLICAZIONI per il periodo 2019-2021 nello schema “Scheda pubblicazioni”.*

*I richiedenti che* ***non sono mai stati sottoposti a VRA*** *dovranno inserire MAX 12 PUBBLICAZIONI per il periodo 2015-2021 nello schema “Scheda pubblicazioni”.*

X **Nuovo**

* rinnovo dott. \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ in scadenza il\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
* durata **12 mesi**
* titolo del progetto di ricerca *“****Sviluppo preclinico di un agonista dei recettori delle orexine per la terapia della narcolessia di tipo 1****”*
* *attività assistenziale* ***X NO*** *□ SI’ (indicare l’azienda di riferimento)*
* costo totale lordo previsto: **24000** Euro
* finanziamento a disposizione del tutor (quota minima pari a 6 mensilità/anno) **12000 Euro** su fondi (indicare la tipologia dei fondi e, se possibile, il codice progetto. In caso di finanziamenti in via di acquisizione allegare lettera di intenti)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **FONDO** | **TITOLARE** | **Euro** |
| RFO SILVANI 2020 | Alessandro Silvani | 2805 |
| RFO SILVANI 2021 | Alessandro Silvani | 2289 |
| RFO ZOCCOLI 2019 | Giovanna Zoccoli | 2469 |
| RFO ZOCCOLI 2020 | Giovanna Zoccoli | 1020 |
| RFO ZOCCOLI 2021 | Giovanna Zoccoli | 900 |
| RFO LO MARTIRE 2020 | Viviana Lo Martire | 740 |
| RFO LO MARTIRE 2021 | Viviana Lo Martire | 500 |
| RFO BASTIANINI 2020 | Stefano Bastianini | 477 |
| RFO BASTIANINI 2021 | Stefano Bastianini | 800 |
| **TOTALE** | **12000** |

* cofinanziamento richiesto (si ricorda che il consiglio ha deliberato di cofinanziare massimo 6 mensilità ad importo minimo) € **12000** pari a n. 6 mensilità
* Commissione proposta (3 commissari esperti della materia + 1 supplente)
* Prof. Roberto Amici
* Prof.ssa Annalisa Bosco
* Prof. Davide Martelli
* Dott.ssa Milena Raffi (supplente)

**SCHEDA PUBBLICAZIONI**

* Pubblicazioni del proponente, che provvederà a fornire sotto sua responsabilità la classificazione

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **N.** | **Estremi bibliografici completi** | **Categoria ISI** **(JCR/TR)** | **Impact****Factor** | **Rank ISI JCR 2019**(comunque la più recente al momento chiusura domanda)**ovvero Q1, Q2, Q3, Q44** | **Punti**(a cura della Commissione) |
| **1.** | Focus on the complex interconnection between cancer, narcolepsy and other neurodegenerative diseases: a possible case of orexin-dependent inverse comorbidity. Mogavero MP\*, Silvani A\*, Del Rosso LM, Salemi M, Ferri R. (\*: joint first authors) **Cancers**, 2021 May 26;13(11):2612. doi: 10.3390/cancers13112612. | **Oncology** | **6,639** | **Q1** |  |
| **2.** | Autonomic mechanisms of blood pressure alterations during sleep in orexin/hypocretin-deficient narcoleptic mice. Alvente S, Berteotti C, Bastianini S, Lo Martire V, Matteoli G, Silvani A, Zoccoli G. **Sleep** 2021;44(7):zsab022.doi: 10.1093/sleep/zsab022. | **Neurology** | **5,849** | **Q1** |  |
| **3.** | Cardiovascular disorders in narcolepsy: review of associations and determinants. Jennum PJ, Plazzi G, Silvani A, Surkin LA, Dauvilliers Y. **Sleep Med Rev** 2021 Jan 23;58:101440. doi: 10.1016/j.smrv.2021.101440.  | **Neurosciences** | **11,609** | **Q1** |  |
| **4.** | Combining information on nocturnal REM sleep latency and atonia to facilitate diagnosis of pediatric narcolepsy type 1. Silvani A\*, Vandi S\*, Pizza F, Antelmi E, Ferri R, Plazzi G. (\*: joint first authors). **Sleep** 2020 Oct 9;zsaa203. doi: 10.1093/sleep/zsaa203.  | **Neurology** | **5,849** | **Q1** |  |

**ALLEGATI**

* Programma di ricerca
* Programma di formazione dell’Assegnista

**PROGRAMMA DI RICERCA**

**Richiesta di un assegno di ricerca cofinanziato su Budget Integrato 2022**

**TUTOR: PROF. ALESSANDRO SILVANI**

**DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE**

**Titolo**

**Sviluppo preclinico di un agonista dei recettori delle orexine per la terapia della narcolessia di tipo 1**

**Stato dell’arte**

Le orexine A e B (OXA e OXB) [1], chiamate anche ipocretine 1 e 2 [2], sono peptidi prodotti da una popolazione di neuroni ipotalamici con attività massima durante la veglia attiva e minima durante il sonno con movimenti oculari rapidi (REM) [3]. Le orexine legano due recettori accoppiati a proteine G, denominati OR1, che è selettivo per OXA, e OR2, che è non selettivo per OXA e OXB [1]. OR1 e OR2 sono ampiamente espressi nel sistema nervoso centrale (SNC) [4], in linea con le diffuse proiezioni dei neuroni orexinergici [5]. Il sistema orexinergico del SNC modula molteplici funzioni fisiologiche, tra cui il comportamento di veglia e sonno, l'omeostasi energetica e il controllo autonomico dell’apparato cardiovascolare [6-8]. I recettori OR1 e OR2 sono espressi anche al di fuori del SNC, in sedi che includono il tessuto adiposo, l’apparato riproduttivo maschile [4], il cuore [9] ed il midollo osseo [10]. I recettori delle orexine al di fuori del SNC possono essere rilevanti per la fisiopatologia dello scompenso cardiaco [9] e dell’aterosclerosi [10] e possono legare le orexine che si riversano nella circolazione sistemica dopo il loro rilascio nel SNC da parte dei neuroni ipotalamici che le producono [10].

Il peptide OXA è relativamente protetto dall'inattivazione da parte delle peptidasi tramite due ponti disolfuro, un residuo piroglutammico N-terminale e l’amidazione C-terminale [1]. Al contrario, OXB è un peptide lineare con un terminale N libero [1] ed è rapidamente metabolizzato nel sangue [11] e persino nel liquido cerebrospinale (CSF) [12]. La permeabilità della barriera ematoencefalica (BEE) a OXA è ancora dibattuta. È stato riportato che OXA entra rapidamente nel cervello del topo per semplice diffusione [11], un risultato in linea con altri esperimenti compiuti su ratti [13, 14] e con dati funzionali ottenuti su cani [15]. Tuttavia, un altro studio ha riportato una penetrazione cerebrale trascurabile (< 1%) di OXA in topi e ratti [16], e anche questa conclusione è stata supportata da dati ottenuti sui cani [17].

La narcolessia di tipo 1 (NT1) è una malattia rara (prevalenza 14/100.000 soggetti [18]) e grave, associata alla perdita quasi completa dei neuroni orexinergici [19] probabilmente a causa di un danno autoimmune [20]. La NT1 è caratterizzata da un'ampia serie di segni e sintomi che includono eccessiva sonnolenza diurna, sonno frammentato con aumento del tono muscolare, maggiore propensione e ridotta latenza al sonno REM con episodi di sonno REM all’inizio del sonno (SOREMs), cataplessia (perdita di tono muscolare durante la veglia, spesso evocata da emozioni positive), una tendenza all'obesità e un profilo di pressione arteriosa non-dipper [7, 20]. Una condizione clinica simile alla NT1 umana si verifica nei cani a causa della mutazione del gene che codifica OR2 o come forma sporadica per carenza delle orexine [21]. Il quadro clinico della NT1 è ricapitolato sia in topi transgenici OX-ATX3 con ablazione genetica dei neuroni orexinergici [22] sia in topi knockout per le orexine (OX-KO) [23]. I dati sui topi doppi knockout (KO) per OR1 e OR2 hanno indicato che la mancanza di legame delle orexine con OR1 e con OR2 è necessaria affinché il fenotipo murino ricapitoli il quadro clinico completo della NT1 umana, con OR2 che svolge il ruolo maggiore [24, 25]. In accordo con questi dati, la terapia genica dell'orexina migliora il fenotipo patologico dei topi OX-ATX3 [26] e OX-KO [27].

Nonostante le conoscenze disponibili sulla fisiologia del sistema orexinergico, nessuna delle terapie attualmente disponibili per la NT1 si basa sulla sostituzione delle orexine e tutte presentano importanti limitazioni in termini di efficacia ed effetti collaterali [28]. I dati preclinici sull’efficacia della terapia sostitutiva con orexine sono contrastanti. In cani con la forma familiare di NT1, l'efficacia terapeutica di OXA per via endovenosa è stata riportata [15] ma non confermata [17]. La somministrazione endovenosa o intratecale di OXA è risultata inefficace anche su un singolo cane con la forma sporadica di NT1 [29]. D’altra parte, la somministrazione intracerebroventricolare (ICV) [26] o intratecale [30] di OXA si è dimostrata efficace nel ridurre la cataplessia nei topi OX-KO, in cui la somministrazione ICV di OXA aumentava anche la durata della veglia [26]. È stato riportato che la somministrazione intra-nasale di OXA comporta una penetrazione cerebrale di OXA paragonabile a quella ottenuta per via endovenosa nei ratti [14] e una riduzione della durata del sonno REM e dell’incidenza di SOREMs in uno studio pilota su pazienti con NT1 [31]. Nel complesso, questi studi indicano che l'efficacia di OXA somministrata per via sistemica è, nella migliore delle ipotesi, assai limitata, e indicano l’'insufficiente permeabilità della BEE come fattore limitante [28].

Sono stati compiuti progressi significativi nello sviluppo di agonisti non peptidici selettivi per OR2 in grado di attraversare la BEE. Il composto 30 [32], rinominato YNT-185 [33], si è dimostrato in grado di aumentare la durata della veglia e diminuire i SOREMs in topi OX-KO dopo somministrazione intraperitoneale, pur con efficacia limitata. Il composto TAK-925 si è dimostrato in grado di aumentare il tempo speso in veglia dopo iniezione sottocutanea (SC) in topi wild-type (WT) di controllo [34] e ha superato uno studio di fase 1 su pazienti con NT1 con somministrazione per infusione endovenosa [35]. Il composto TAK-988 si è dimostrato biodisponibile per via orale ed in grado di aumentare il tempo speso in veglia e diminuire la cataplessia nei topi OX-ATX3 [36] e di aumentare il tempo speso in veglia in primati non umani [37]. Anche se tutti questi agonisti selettivi dei recettori OR2 hanno il potenziale di contribuire alla terapia della NT1, le conoscenze sulla fisiologia del sistema orexinergico e sulla fisiopatologia della NT1 indicano che sarebbe necessario reintegrare il legame delle orexine sia ai recettori OR1 sia ai recettori OR2 per risolvere completamente il quadro clinico della NT1. In particolare, è stato dimostrato che la severità della cataplessia è modesta nei topi OR2-KO, in cui il legame delle orexine a OR1 è preservato, mentre è elevata nei topi OX-KO, in cui mancano del tutto le orexine, quindi anche il loro legame sia a OR1 sia a OR2 [24]. In topi doppi KO per OR1 e OR2, l’espressione tramite vettore virale di OR2 nel rafe dorsale si è dimostrato prevenire l’insorgenza di cataplessia, potenzialmente attivando in modo non fisiologico i neuroni serotoninergici di questa struttura, che esprimono fisiologicamente sia OR1 sia OR2, ma non è comunque stata in grado di prevenire l’eccesso di sonno REM durante il periodo di attività (buio) [25]. Dati recenti hanno evidenziato una tendenza all’aterosclerosi in topi OX-KO, dovuta alla mancanza di attivazione di recettori OR1 espressi da precursori emopoietici nel midollo osseo [10]. Non vi è evidenza disponibile sullo sviluppo di agonisti dei recettori OR1 e OR2 in grado di attraversare la BEE dopo somministrazione sistemica ed efficaci nella terapia della NT1.

**Obiettivo del progetto**

Proseguire lo sviluppo preclinico di un nuovo agonista dei recettori delle orexine per la terapia della narcolessia di tipo 1

**Sintesi delle attività del progetto**

**Molecole oggetto dello studio**

Il progetto verterà sullo sviluppo di una molecola attualmente in fase di deposito brevettuale da parte dell’Università di Bologna, della quale il proponente di questo progetto rappresenta il principale inventore. Nell’incertezza che questo documento costituisca divulgazione e possa compromettere le procedure brevettuali a danno dell’Università di Bologna, la molecola viene di seguito semplicemente identificata come ARO (agonista dei recettori per le orexine). Il proponente di questo progetto è a disposizione dei revisori di questa proposta progettuale per condividere in modo riservato se necessario i dettagli sulla struttura chimica di ARO. ARO è stata disegnata per attraversare la BEE ed agire sul SNC dopo somministrazione periferica come doppio agonista dei recettori OR1 e OR2 per le orexine. ARO è stata sintetizzata su indicazione del proponente del progetto dalla ditta Genscript ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)) in forma liofilizzata con purezza HPLC ≥ 95%.

**Esperimenti in vivo**

Obiettivo. Gli esperimenti in vivo hanno l’obiettivo di produrre dati pilota sull’efficacia comparativa di ARO nel sopprimere la cataplessia in un modello murino validato di NT1, i topi OX-KO [23], in funzione della fase circadiana di somministrazione.

Risultati preliminari. I risultati preliminari ottenuti a supporto della domanda di deposito brevettuale di ARO attualmente in corso hanno dimostrato che la somministrazione sottocutanea di ARO (160 μM in 1 mL di soluzione fisiologica) all’accensione delle luci (Zeitgeber time 0, ZT0) riduceva significativamente il tempo trascorso in stati simil-cataplettici (cataplexy-like states) [38] durante il periodo di attività (buio: ZT 13-24) in topi OX-KO femmina rispetto alla somministrazione di veicolo (P < 0.05, test di Wilcoxon a due code con significatività esatta con metodo Monte Carlo, N = 12). Lo stato simil-cataplettico (cataplexy-like state) nel modello murino di narcolessia è definito unicamente in base ai segnali elettroencefalografici (EEG) ed elettromiografici (EMG) in accordo con criteri definiti per consenso tra esperti; in caso di reperto video simultaneo di arresto motorio improvviso lo stato simil-cataplettico può essere confermato come cataplettico [38]. Il risultato preliminare ottenuto è stato confermato in base all’analisi delle videoregistrazioni con illuminazione agli infrarossi e telecamera sensibile agli infrarossi in un sottogruppo di topi (N = 4). Ciò è in accordo con evidenza di una completa sovrapposizione fra episodi simil-cataplettici ed episodi cataplettici durante il periodo di buio in un modello murino di NT1 [39].

Sintesi delle procedure sperimentali. Gli esperimenti saranno compiuti su topi OX-KO [23], un modello validato di NT1 con deficienza congenita delle orexine. I topi saranno ottenuti da una colonia riproduttiva interna già disponibile nello stabulario roditori del DIBINEM e stabulati con ciclo luce buio di 12:12 ore. Si studieranno topi femmina per confronto con i risultati preliminari (si veda sopra) e perché dati recenti indicano che l’incidenza spontanea basale di episodi cataplettici è maggiore nei topi OX-KO femmine rispetto ai maschi [40]. I topi saranno sottoposti ad intervento chirurgico in anestesia generale (isoflurano in ossigeno) con trattamento analgesico per l’impianto di minielettrodi per la registrazione dei segnali EEG e EMG, atti a permettere una quantificazione del comportamento di veglia e di sonno, come già decritto in dettaglio dal nostro gruppo [41]. Dopo 1-2 settimane di recupero post-operatorio ciascun topo sarà sottoposto a 4 sessioni di registrazione da 24 ore ciascuna in 2 settimane. Le registrazioni interesseranno i segnali EEG e EMG in animali liberi di muoversi grazie all’impiego di connettori elettrici rotanti e di supporti bilanciati per sostenere il peso dei cavi elettrici di connessione fra gli animali e gli amplificatori. Si effettueranno registrazioni video sincronizzate con quelle dei biosegnali durante il periodo di buio impiegando una fotocamera ad alta risoluzione sensibile agli infrarossi ed un illuminatore ambientale ad infrarossi. Gli animali avranno accesso a cioccolata oltre alla loro dieta standard durante il periodo di buio per massimizzare l’incidenza di cataplessia [40].

In ciascuna settimana, si effettuerà una registrazione con iniezione sottocutanea di 1 mL di soluzione fisiologica (veicolo), seguita dopo 48 ore da un’altra registrazione con iniezione sottocutanea di ARO alla concentrazione di 160 μM in 1 mL di fisiologica. In ciascuna settimana, l’iniezione di veicolo e quella di ARO saranno effettuate allo stesso orario in relazione all’accensione delle luci. In una delle due settimane le iniezioni si effettueranno all’accensione delle luci (ZT0), mentre nell’altra esse si effettueranno 1 ora prima dello spegnimento delle luci (ZT11), per non interferire col normale comportamento durante il periodo di buio. Lo ZT (0 o 11) delle iniezioni durante la prima settimana sarà sorteggiato in modo casuale per ciascun topo. Le registrazioni inizieranno a ZT0 indipendentemente dall’orario di iniezione. In base a recenti dati che il ciclo estrale influenza l’incidenza di cataplessia nei topi OX-KO [40], al termine di ciascuna registrazione si valuterà il ciclo estrale degli animali in base all’osservazione dei genitali esterni ([https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/september/six-steps-for-setting-up-timed-pregnant-mice)](https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2014/september/six-steps-for-setting-up-timed-pregnant-mice%29e) e all’analisi citologica del lavaggio vaginale [42].

Gli episodi simil-cataplettici saranno individuati in base a criteri standard in base ai segnali EEG e EMG [38] e confermati come cataplettici in base alla videoregistrazione, avendo cura di anonimizzare i segnali ed i video prima della valutazione per evitare errori sistematici. Il numero, la durata media e la durata complessiva degli episodi cataplettici saranno confrontati tra veicolo e ARO per ciascun tempo di somministrazione (ZT0 o ZT11) e fra le somministrazioni di ARO a ZT0 rispetto a ZT11. Le ipotesi sono che: (a) ARO sia efficace nel ridurre la cataplessia durante il periodo di buio sia quando somministrata a ZT0 (confermando i risultati preliminari), sia quando somministrata a ZT11; e (b) l’efficacia di ARO nel ridurre la cataplessia durante il periodo di buio sia superiore con somministrazione a ZT11 rispetto alla somministrazione a ZT0, per via del minor tempo intercorso per il catabolismo di ARO nella prima condizione.

Si pianifica una numerosità sperimentale di N = 5 per uno studio pilota che consenta di verificare la fattibilità della strategia di somministrazione a ZT11 rispetto alla comparsa di cataplessia durante il periodo di buio (ciò sarà verificabile in base all’eventuale soppressione della cataplessia notturna per lo stress determinato dall’iniezione di veicolo a ZT11 rispetto a ZT0) e di raccogliere dati preliminari sulla differenza di efficacia di ARO tra ZT11 e ZT0 per definire, tramite analisi di potenza statistica, la numerosità campionaria necessaria per verificare l’ipotesi (b) sopra indicata.

La fattibilità delle procedure sperimentali in vivo è supportata dalla disponibilità di topi OX-KO da colonia riproduttiva interna e dal fatto che l’approccio sperimentale corrisponde a quello già impiegato dal nostro gruppo di ricerca in pubblicazioni precedenti [41] e nella raccolta dei dati preliminari sopra menzionati. Il proponente di questo progetto ha inoltre già ottenuto l’autorizzazione etica a svolgere gli esperimenti in vivo con l’impiego di OXA e ARO (progetto “Caratterizzazione dettagliata dell’attività in vivo nel topo (Mus musculus) di agenti orexinergici innovativi per la terapia della narcolessia di tipo 1”, aut. N. 667/2019/PR, scadenza 23 settembre 2023).

**Esperimenti in vitro**

Obiettivo. Gli esperimenti in vitro hanno l’obiettivo di quantificare il profilo di attività di ARO sui recettori OR1 e OR2 in diversi sistemi di espressione cellulare.

Risultati preliminari. I risultati preliminari ottenuti a supporto della domanda di deposito brevettuale di ARO attualmente in corso hanno dimostrato che ARO a concentrazione 8,5 μM causava un aumento della concentrazione intracellulare di ioni calcio prossimo a quello massimale, evocato da OXA alla concentrazione 14,8 μM, in cellule di neuroblastoma murino trasfettate per esprimere stabilmente recettori umani OR1 o OR2 [43], mentre non causava alcun effetto significativo in cellule di controllo che non esprimevano recettori OR1 o OR2. I cloni cellulari in parola sono stati ottenuti tramite donazione dal prof. J. Kukkonen, Università di Helsinki, e l’effettiva espressione selettiva dei recettori OR1 o OR2 (o l’assenza di espressione di entrambi i recettori OR1 e OR2 nelle cellule di controllo) sono stati verificati tramite trattamento con DNAsi, retrotrascrizione e PCR real-time. Tuttavia, i dati ottenuti non hanno ancora permesso di calcolare la concentrazione di ARO che evoca una risposta semi-massimale (EC50) tramite OR1 e tramite OR2. Vi è inoltre evidenza che il profilo di selettività recettoriale degli agonisti orexinergici dipenda dal sistema cellulare di espressione dei recettori [44].

Sintesi delle procedure sperimentali. Si seguiranno due approcci sperimentali indipendenti per determinare la concentrazione di ARO che evoca una risposta semi-massimale (EC50) tramite OR1 e tramite OR2.

Il primo approccio espanderà quello impiegato per ottenere i risultati preliminari sopra menzionati. Si utilizzeranno cellule Neuro2A di neuroblastoma murino transfettate per esprimere stabilmente i recettori umani OR1 o OR2 per le orexine ed un clone di cellule di neuroblastoma di controllo che non esprime né OR1 né OR2 [43]. Gli aumenti della concentrazione intracellulare di ioni calcio evocati da diverse concentrazioni di ARO e di OXA saranno misurati tramite reattivo Invitrogen Fluo-4 Direct Calcium Assay e dispositivo Tekan Spark presso il Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA) al Policlinico S. Orsola-Malpighi. I risultati saranno analizzati tramite interpolazione con una funzione sigmoidale per ottenere le stime di EC50 di ARO per OR1 e OR2 e confrontarle con quelle di OXA, in base a dati almeno in triplicato.

 Nel secondo approccio gli esperimenti saranno effettuati con specifici reporter assay kit per OR1 e OR2 (items 600240 and 600250, Cayman chemical, www.caymanchem.com) basati su cellule Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) transfettate in modo transitorio con OR1 o OR2, una proteina G ricombinante e un reporter costituito da fosfatasi alcalina secreta regolato da un elemento di risposta a cAMP [45]. Come nel primo approccio indicato sopra, anche questi risultati saranno analizzati tramite interpolazione con una funzione sigmoidale per ottenere le stime di EC50 di ARO per OR1 e OR2 e confrontarle con quelle di OXA, in base a dati almeno in triplicato.

 La fattibilità delle procedure sperimentali in vitro è supportata dalla disponibilità dei cloni cellulari necessari per il primo approccio sperimentale e dalla disponibilità in commercio degli assay kit per il secondo approccio sperimentale, oltre che dall’impiego del primo approccio sperimentale per l’ottenimento dei dati preliminari sopra menzionati.

Letteratura citata:

[1] Cell. 1998;92:573–85. PMID 9491897

[2] Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95:322-7. PMID 9419374

[3] Neuron. 2005;46:787–98. PMID 15924864

[4] Br J Pharmacol. 2014;171: 294–313 PMID: 23848055

[5] J Neurosci. 1998;18:9996–10015. PMID 9822755

[6] Nat Rev Neurosci. 2007;8:171–181. PMID 17299454

[7] Neurology. 2014;82: 271-8. PMID 24363130

[8] Clinical and Translational Neuroscience. 2018;2(2). doi:10.1177/2514183X18789327

[9] J Am Coll Cardiol. 2015;66:2522–33. PMID 26653627

[10] Nature. 2019;566:383–7. PMID 30760925

[11] J Pharmacol Exp Ther. 1999;289:219–23. PMID 10087007

[12] Neurosci Lett. 2003;346:182–6. PMID 12853114

[13] Peptides. 2002;23:1673–81. PMID 12217428

[14] ACS Chem Neurosci. 2018;9:358–68. PMID 29035509

[15] Sleep Res Online. 2000;3:23–8. PMID 11382896

[16] Pain. 2001;92:81–90. PMID 11323129

[17] Sleep. 2003;26:953–9. PMID 14746374

[18] Sleep. 2019;42:zsz091. PMID 31004158

[19] Nature Med. 2000;6:991–7. PMID 10973318

[20] Nature Rev Neurosci. 2019;20:83-93. PMID 30546103

[21] Immunol Res. 2014;58:315-39. PMID 24825774

[22] Neuron. 2001;30:345–54. PMID 11394998

[23] Cell. 1999;98:437–51. PMID 10481909

[24] Neuron. 2003;38:715–30. PMID 12797957

[25] J Clin Invest. 2014;124:604–16. PMID 24382351

[26] Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:4649–54. PMID 15070772

[27] Eur J Neurosci. 2008;28:1382–93. PMID 18973565

[28] Progr Neurobiol. 2017;152:89-113. PMID 26721620

[29] J Vet Intern Med. 2004;18:586–8. PMID 15320603

[30] Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115:6046–51. PMID 29784823

[31] Sleep Med. 2011;12:941–6. PMID 22036605

[32] J Med Chem. 2015;58:7931–7. PMID 26267383

[33] Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114:5731–6. PMID 28507129

[34] Pharmacol Biochem Behav. 2019;187:172794. PMID 31654653

[35] J Sleep Res. 2020;29(S1):72 (Abstract P06)

[36] J Sleep Res. 2020;29(S1):175 (Abstract P213)

[37] J Sleep Res. 2020;29(S1):175–6 (Abstract P214)

[38] Sleep. 2009;32:111-6. PMID 19189786.

[39] Exp Neurol. 2009;217:46-54. PMID: 19416673

[40] Sleep. 2022;zsac089. doi: 10.1093/sleep/zsac089. PMID: 35429396

[41] Sleep. 2011;34:213-8. PMID: 21286242

[42] PLoS One. 2012;7(4):e35538. PMID: 22514749

[43] FEBS Letters. 2002;526:11-4. PMID: 12208495

[44] Neurosci Lett. 2011;494:57–60. PMID: 21362456

[45] Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020;24:5127–39. PMID: 32432777

**PROGRAMMA DI FORMAZIONE DELL’ASSEGNISTA**

**Richiesta di un assegno di ricerca cofinanziato su Budget Integrato 2022**

**TUTOR: PROF. ALESSANDRO SILVANI**

**DIP. SCIENZE BIOMEDICHE E NEUROMOTORIE**

**Titolo**

**Sviluppo preclinico di un agonista dei recettori delle orexine per la terapia della narcolessia di tipo 1**

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

Il o la titolare dell’assegno collaborerà alle seguenti attività: gestione della colonia di topi knock-out per le orexine (OX-KO); costruzione di elettrodi per registrazioni elettroencefalografiche (EEG) ed elettromiografiche (EMG); attività microchirurgica di impianto di elettrodi EEG e EMG; registrazioni EEG, EMG e video in topi liberi di muoversi; discriminazione degli stati di veglia e sonno e cataplessia in base all’analisi dei tracciati EEG, EMG e video; gestione dei cloni cellulari Neuro2a e HEK293; saggi di risposta cellulare a diverse concentrazioni di agonisti dei recettori orexinergici; 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 e i cloni cellulari non in commercio sono già disponibili 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 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, fisiologia del sistema nervoso e fisiologia cellulare.

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. 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).