

# Effetti del trattamento con un antagonista del recettore prostanoide A2 del trombossano sul neurosviluppo in un modello murino di sindrome di Down

## Sindrome di Down e sviluppo cerebrale

La sindrome di Down (SD) è una condizione genetica legata alla triplicazione del cromosoma 21. Questa patologia colpisce circa 1 su 850-1000 nati vivi (1). La presenza di geni triplicati causa alterazioni nello sviluppo somatico, come malformazioni cardiache e gastroenterologiche e alterazioni del neurosviluppo. la condizione maggiormente invalidante per i soggetti affetti da SD è la disabilità cognitiva, dovuta ad ipotrofia cerebrale (2, 3). Le ridotte dimensioni del cervello nella SD sono principalmente legate ad una ridotta neurogenesi e ad alterazioni nello sviluppo dendritico, che si protraggono per tutta la vita dell'individuo. Il numero ridotto di neuroni e di contatti sinaptici implica una scarsa elaborazione dei segnali neuronali che è alla base delle gravi alterazioni presentate dai soggetti con SD in diversi domini cognitivi. Uno dei principali processi neuropatologici responsabili dei deficit della funzione neuronale e del deterioramento cognitivo è l'aumento dello stress ossidativo cerebrale che rappresenta un evento precoce nella DS (4). Questa alterazione, che è il risultato dello squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'induzione di difese antiossidanti, nella DS è in parte dovuta ad alterazioni di componenti del sistema antiossidante endogeno e alla sovraespressione di diversi geni che codificano proteine specifiche direttamente o indirettamente coinvolte nella produzione di ROS (5). Lo stress ossidativo nella DS è anche strettamente associato ad alterazioni della funzione mitocondriale, considerando che i mitocondri sono la principale fonte e uno dei principali bersagli dei radicali liberi. È stato dimostrato che a partire dalle prime fasi dello sviluppo si verificano significative alterazioni mitocondriali strutturali e funzionali. Queste alterazioni sono causate da una perdita di equilibrio tra i meccanismi di biogenesi e turnover mitocondriale (6, 7) che si traducono in alterazioni morfologiche caratterizzate da frammentazione dei mitocondri, anomalie delle loro creste e rottura della rete mitocondriale, come osservato in colture di neuroni e astrociti trisomici e in fibroblasti fetali (6, 8). I difetti nella funzione mitocondriale contribuiscono a un aumento dello stress ossidativo cerebrale. L'aumento dello stress ossidativo causa a sua volta disfunzione mitocondriale. Pertanto, si verifica un circolo vizioso nella DS che compromette irreversibilmente il metabolismo energetico e la produzione mitocondriale di ATP. È importante notare che i principali processi neuroevolutivi, tra cui la proliferazione e la differenziazione cellulare, la crescita assonale e dendritica, la formazione di spine dendritiche e contatti sinaptici, dipendono fortemente dalla produzione di ATP da parte dei mitocondri cerebrali tramite il sistema di fosforilazione ossidativa. Questi risultati sono stati confermati anche nella DS da alcuni studi in vitro che hanno mostrato una stretta correlazione tra disfunzioni mitocondriali e una riduzione della proliferazione e della differenziazione neurale delle cellule progenitrici neurali trisomiche (NPC) (9, 10). Al momento non ci sono terapie per i soggetti affetti da SD.

## Stato dell'arte

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha compiuto numerosi sforzi rivolti allo sviluppo di terapie farmacologiche atte a migliorare la disabilità cognitiva nella SD, cercando principalmente di correggere lo sviluppo cerebrale. Per fare ciò gli studiosi si avvalgono solitamente di modelli murini ingegnerizzati, sviluppati a partire dagli anni '70, che mimano i principali difetti della SD. Il meglio caratterizzato e più utilizzato modello murino di SD è il topo Ts65Dn (11) che mostra difetti dello sviluppo cerebrale (già durante le prime fasi dello sviluppo embrionale) e cognitivi, difetti che si protraggono durante tutta la vita dell'animale (12, 13, 14, 15). I topi Ts65Dn mostrano anche un aumento dello stress ossidativo (perossidazione lipidica e carbonilazione proteica) e disfunzione mitocondriale nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale, che influisce sulla struttura e sulla funzione del cervello (5, 16). Il topo Ts65Dn mostra anche livelli aumentati di peptidi APP e A $\beta$  (17, 18). Inoltre, nei topi adulti Ts65Dn è stato dimostrato un aumento della neuroinfiammazione dovuto all'attivazione della microglia nell'ippocampo e nel setto mediale e all'espressione alterata di citochine infiammatorie nel cervello (19). Il nostro gruppo utilizza da anni questo modello di topo per lo sviluppo di strategie terapeutiche potenzialmente traslabili all'essere umano. Poiché nel topo i processi di neurogenesi e dendritogenesi avvengono principalmente durante le fasi di sviluppo perinatale (20, 21), questa finestra temporale rappresenta un momento cruciale in cui intervenire farmacologicamente. Studi recenti prodotti dal

nostro gruppo di ricerca dimostrano come differenti trattamenti farmacologici nell'immediato periodo postnatale (dal terzo al quindicesimo giorno di vita, P3-P15) nel topo Ts65Dn, siano in grado di ripristinare correttamente lo sviluppo cerebrale (neurogenesi, dendritogenesi e formazione terminali sinaptici) (22, 23, 24, 25, 26, 27). Abbiamo inoltre dimostrato che differenti trattamenti prolungati fino all'età adulta (P45) in questo modello murino sono in grado di indurre un miglioramento nella maturazione dei circuiti ippocampali con effetti sulla risposta comportamentale degli animali (28).

### **Razionale per l'utilizzo di un antagonista del recettore prostanoide del trombossano (TPR) per migliorare il deterioramento cognitivo nella DS**

Il trombossano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) è il principale prodotto del metabolismo dell'acido arachidonico (AA) nelle piastrine che, in risposta a vari stimoli, viene prodotto attraverso l'attività della ciclossigenasi (COX) e della TX sintasi (TXS). Attraverso la sua interazione con la TPR sulle piastrine, il TXA<sub>2</sub> è un potente induttore dell'attivazione piastrinica. Tuttavia, altri ligandi agiscono sul TPR, in particolare gli endoperossidi delle prostaglandine (PG) e gli isoprostani, che sono prodotti specifici della perossidazione dei lipidi di membrana, prodotti in condizioni patologiche di infiammazione e stress ossidativo. Questi recettori sono recettori accoppiati a proteine G (GPCR) legati alla membrana, presenti non solo sulle piastrine ma ampiamente espressi in molti tipi di cellule, tra cui le cellule infiammatorie, le cellule endoteliali vascolari, le cellule muscolari lisce e le cellule gliali e nervose. Le TPR mediano quindi molteplici meccanismi di segnalazione e regolazione cellulare, che comprendono il citoscheletro, l'adesione cellulare, la motilità, i fattori di trascrizione nucleare, la proliferazione, la sopravvivenza cellulare e l'apoptosi. È dimostrato che i ROS, generati dall'attivazione di TPR o provenienti da altre fonti, possano aumentare la stabilità della proteina TPR, con conseguente aumento dell'espressione della stessa, che a sua volta potrebbe amplificare le risposte tra TXA<sub>2</sub>/isoprostano (29). Questo meccanismo potrebbe avere un ruolo sostanziale nella patogenesi di condizioni cliniche associate a un maggiore stress ossidativo, come lo sviluppo neurologico nella DS. Inoltre, le modifiche post-trascrizionali, come la fosforilazione o la glicazione, influenzano l'internalizzazione della TPR o la desensibilizzazione al ligando. L'impatto di un antagonista del TP su questo crosstalk recettoriale e sulle vie di regolazione associate rimane una questione aperta. Inoltre, una caratteristica della DS è la presenza del gene triplicato della proteina precursore dell'amiloide (APP), coinvolta in diverse funzioni cellulari, in particolare nella crescita, nella riparazione e nel mantenimento dei neuroni. La sua elaborazione enzimatica dà origine al peptide  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ), uno dei principali costituenti delle placche amiloidi, la cui deposizione nel parenchima cerebrale e nei vasi cerebrali è la prima firma patologica della malattia di Alzheimer (AD) (30). La sua sovraespressione nella DS è stata dimostrata essere legata alla disfunzione del compartimento lisosomiale ed endosomiale (31, 32). È importante notare che le piastrine sono cruciali per il metabolismo dell'APP, poiché sono la principale fonte di APP circolante (33). Al momento dell'attivazione, rilasciano quantità significative di  $A\beta$ . Questo, a sua volta, aumenta lo stress ossidativo e l'infiammazione, creando un circolo vizioso che attiva ulteriormente le piastrine (34). In un modello murino della malattia di Alzheimer, è stato dimostrato che nel cervello l'attivazione della TPR da parte degli isoprostani, marcatori della perossidazione lipidica in vivo, aumenta la stabilità dell'mRNA dell'APP, fornendo un maggior substrato per la scissione dell' $\alpha$  e  $\beta$  secretasi, con un conseguente aumento della generazione di beta-amiloide ( $A\beta$ ). È interessante notare che il trattamento con TPR è stato in grado di ridurre i livelli di APP,  $A\beta$  e le placche amiloidi (35). Poiché la segnalazione TPR gioca un ruolo nella regolazione dei livelli di APP, potrebbe rappresentare un bersaglio per una terapia nella DS, considerando il ruolo cruciale del gene triplicato APP sulla compromissione della proliferazione delle NPCs e sulle alterazioni della neurogenesi (36). La triplicazione del gene APP è stata implicata anche nell'aumento della produzione di ROS nella DS. Infatti, l'accumulo di peptidi  $A\beta$  è stato associato allo stress ossidativo e alla disfunzione mitocondriale legati alla DS (37, 38). Inoltre, indipendentemente dalla deposizione di  $A\beta$ , l'APP può causare disfunzione mitocondriale e questa potrebbe essere un'ulteriore fonte dell'aumento della OS nella DS (39). Sulla base di tutte queste premesse, il trattamento con un antagonista TPR, riducendo i livelli di APP, potrebbe avere un effetto benefico diretto sulla neurogenesi ed effetti positivi indiretti sullo sviluppo, la maturazione e la funzione neuronale, riducendo lo stress ossidativo e migliorando la funzione mitocondriale. Si ritiene che l'attivazione di TPR sia coinvolta anche nella risposta infiammatoria. Infatti, l'aumento dell'espressione di TPR in un modello murino

di lesione cerebrale è stato trovato associato all'attivazione di microglia/macrofagi e il trattamento con l'antagonista TP SQ29548 è risultato in grado di ridurre l'attivazione della risposta infiammatoria (40). Nella DS, l'attivazione microgliale in alcune regioni cerebrali e un profilo neuroinfiammatorio sono presenti fin dalle fasi della vita fetale (41), suggerendo che queste alterazioni possono avere un impatto negativo sui processi chiave del neurosviluppo.

Inoltre, dati preliminari ottenuti dal nostro laboratorio mostrano l'espressione del TPR nell'ippocampo e corteccia del topo Ts65Dn già dalle primissime fasi di vita. Ulteriori dati preliminari hanno evidenziato la capacità di un antagonista di questo recettore di attraversare la barriera ematoencefalica del topo dopo somministrazione sottocutanea. Sulla base di queste evidenze il trattamento con un antagonista TPR potrebbe contribuire al miglioramento dello sviluppo cerebrale nella DS.

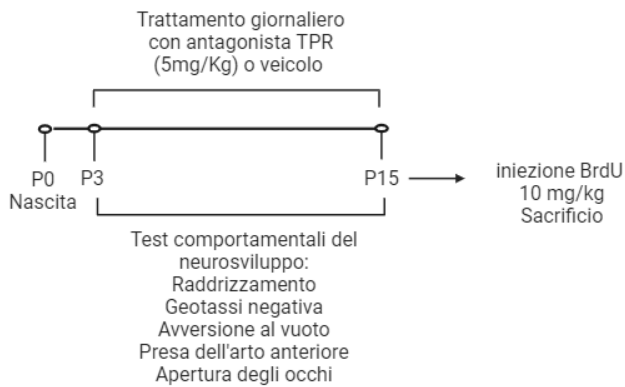
### **Scopo del progetto**

L'obiettivo del presente studio è esaminare per la prima volta l'effetto di un trattamento precoce con un antagonista del recettore TP sulle principali alterazioni del neurosviluppo del cervello trisomico, utilizzando il modello murino Ts65Dn. A tal fine, testeremo l'efficacia di questa strategia farmacologica nel primo periodo postnatale, sfruttando il fatto che questa finestra temporale rappresenta ancora un periodo critico per la neurogenesi nel DG ippocampale e per la maturazione dendritica e la formazione dei circuiti neuronali in tutto il cervello. È importante notare che testeremo due diverse fasce d'età nei topi. Considerando che i roditori sono immaturi alla nascita in termini di sviluppo neurale e hanno uno sviluppo postnatale accelerato rispetto all'uomo, il primo gruppo di età sarà trattato durante il primo periodo neonatale, che corrisponde all'incirca al periodo prenatale (ultimo trimestre di gestazione dell'uomo fino alla nascita). Questa finestra temporale dovrebbe essere ottimale per imitare nei roditori gli effetti di un trattamento durante l'ultima gestazione nell'uomo. Il secondo gruppo di topi sarà trattato durante la fase iniziale del post-svezzamento (periodo prepuberale/periadolescenziale), che corrisponde al periodo dell'adolescenza media nell'uomo. Queste due diverse finestre temporali di trattamento aiuteranno a determinare il periodo ottimale per un futuro studio clinico. Un altro obiettivo chiave dello studio è valutare se un eventuale miglioramento della neurogenesi e della dendritogenesi si traduca in un miglioramento delle funzioni di apprendimento e memoria dipendenti dall'ippocampo al raggiungimento dell'adolescenza. Questo ci permetterebbe di stabilire se il trattamento farmacologico migliora le funzioni cognitive.

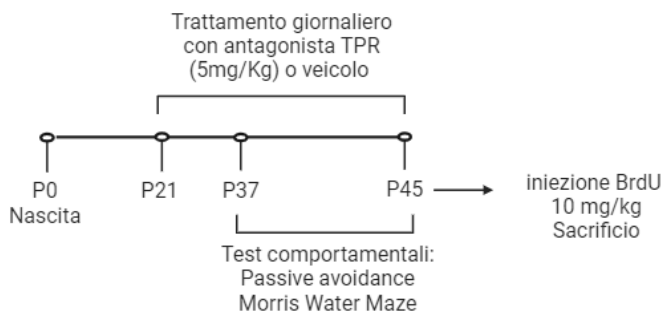
### **Piano di attività**

I topi nati nel nostro allevamento da accoppiamenti tra femmine B6EiC3Sn.BLiA-Ts(1716)65Dn/DnJ (Ts65Dn) e maschi C57BL/6JEiJxC3H/HeSnJ (B6EiC3Sn) F1 (wild type) verranno trattati secondo lo schema seguente:

- 1) **TRATTAMENTO POSTNATALE PRECOCE**: per valutare l'effetto del trattamento sul neurosviluppo tratteremo gli animali da P3 a P15 con una dose giornaliera sottocutanea di antagonista del TPR (5 mg/kg) o con veicolo. Durante il trattamento sottoporremo gli animali a test comportamentali mirati a valutare l'effetto sulle tappe fondamentali dello sviluppo neonatale (Hill et al., 2008). L'ultimo giorno di trattamento gli animali saranno iniettati con Bromodeossiridina (10 mg/kg), un intercalante del DNA, due ore prima del sacrificio per marcare tutte le cellule in fase S (proliferanti) per valutare l'effetto del trattamento sulla neurogenesi. Tutti i dati ottenuti dalle analisi del trattamento verranno analizzati con test statistici adeguati (Test di parametricità Shapiro-Wilk, ANOVA a due vie, ANOVA mista a tre vie, test U di Mann-Whitney).



- 1) **TRATTAMENTO POSTNATALE TARDIVO:** per valutare l'effetto del trattamento sulla maturazione cerebrale tratteremo gli animali da P21 a P45 con una dose giornaliera sottocutanea di antagonista del TPR (5 mg/kg) o con veicolo. Una decina di giorni prima della fine del trattamento sottoporremo gli animali a test comportamentali (Passive avoidance e Morris water maze) per testare l'effetto del trattamento sulle funzioni di memoria ippocampo-dipendenti. L'ultimo giorno di trattamento gli animali saranno iniettati con Bromodeossiuridina (10 mg/kg), un intercalante del DNA, due ore prima del sacrificio per marcare tutte le cellule in fase S (proliferanti) per valutare l'effetto del trattamento tardivo sulla rimanente neurogenesi. Tutti i dati ottenuti dalle analisi del trattamento verranno analizzati con test statistici adeguati (Test di parametricità Shapiro-Wilk, ANOVA a due vie, ANOVA mista a tre vie, test U di Mann-Whitney).



I cervelli saranno prelevati e sottoposti ad analisi come indicato nella tabella seguente:

Analisi	Tecnica	Target	Età dei topi
Proliferazione cellulare	IF	BrdU, DCX	P15-P45
Volume delle regioni cerebrali di interesse e cellularità	Colorazione Nissl/Hoechst		P15-P45
Neuroinfiammazione	IF	Iba1	P15-P45
Espressione proteica legata alla neuroinfiammazione	WB	p-STAT3, p-STAT1, STAT3, STAT1, ERK1, ERK2	P15-P45
Sviluppo dendritico	Impregnazione Golgi		P15-P45
Espressione proteica legata al neurosviluppo	WB	APP, AICD, βCTF, αCTF, PTCH1	P15-P45
Stress ossidativo	Kit di perossidazione lipidica	MDA	P15-P45
Produzione ROS	Spettrofluorometria	H2O2	P15-P45
Produzione ATP	ATP determination kit	ATP	P15-P45
Test comportamentali del neurosviluppo	SR, NG, CA, FG, EO	Precoce neurosviluppo	P15

Test comportamentali	PA, MWM,	Memoria ippocampo-dipendente	P45
----------------------	----------	------------------------------	-----

Abbreviazioni: IF, immunofluorescenza; WB, western blot analisi; MWM, Morris Water Maze; WB, western blot; SR, riflesso di raddrizzamento; NG, riflesso legato alla geotassi negativa; CA, riflesso dell'avversione al vuoto; FG, capacità di presa dell'arto anteriore; EO, apertura occhi.

## Bibliografia

- 1) Shin M, Besser LM, Kucik JE, Lu C, Siffel C, Correa A; Congenital Anomaly Multistate Prevalence and Survival Collaborative. Prevalence of Down syndrome among children and adolescents in 10 regions of the United States. *Pediatrics*. 2009.
- 2) Dierssen M, Herault Y, Estivill X. Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. *Physiol Rev*. 2009 Jul;89(3):887-920.
- 3) Bartesaghi R, Guidi S, Ciani E. Is it possible to improve neurodevelopmental abnormalities in Down syndrome? *Rev Neurosci*. 2011;22(4):419-55.
- 4) Perluigi M, di Domenico F, Fiorini A, Cocciolo A, Giorgi A, Foppoli C, Butterfield DA, Giorlandino M, Giorlandino C, Schinina ME, Coccia R. Oxidative stress occurs early in Down syndrome pregnancy: A redox proteomics analysis of amniotic fluid. 2011 Apr;5(3-4):167-78.
- 5) Rueda Revilla N, Martinez-Cue C. Antioxidants in Down Syndrome: From Preclinical Studies to Clinical Trials. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug 3;9(8):692.
- 6) Izzo A, Nitti M, Mollo N, Paladino S, Procaccini C, Faicchia D, Cali G, Genesisio R, Bonfiglio F, Cicatiello R, Polishchuk E, Polishchuk R, Pinton P, Matarese G, Conti A, Nitsch L. Metformin restores the mitochondrial network and reverses mitochondrial dysfunction in Down syndrome cells. *Hum Mol Genet*. 2017 Mar 15;26(6):1056-1069.
- 7) Mollo N, Cicatiello R, Aurilia M, Scognamiglio R, Genesisio R, Charalambous M, Paladino S, Conti A, Nitsch L, Izzo A. Targeting Mitochondrial Network Architecture in Down Syndrome and Aging. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 29;21(9):3134
- 8) Helguera P, Seiglie J, Rodriguez J, Hanna M, Helguera G, Busciglio J. Adaptive downregulation of mitochondrial function in down syndrome. *Cell Metab*. 2013 Jan 8;17(1):132-40.
- 9) Valenti D, de Bari L, de Rasmio D, Signorile A, Henrion-Caude A, Contestabile A, Vacca RA. The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1862(6):1093-104.
- 10) Valenti D, Rossi L, Marzulli D, Bellomo F, De Rasmio D, Signorile A, Vacca RA. Inhibition of Drp1- mediated mitochondrial fission improves mitochondrial dynamics and bioenergetics stimulating neurogenesis in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 Dec;1863(12):3117-3127.
- 11) Davisson MT, Schmidt C, Reeves RH, Irving NG, Akeson EC, Harris BS, Bronson RT. Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res*. 1993;384:117-33.
- 12) Escorihuela, R.M., et al. (1998) Impaired Shortand Long-Term Memory in Ts65Dn Mice, a Model for Down Syndrome. *Neuroscience Letters*, 247, 171-174.
- 13) Costa AC, Walsh K, Davisson MT. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav*. 1999 Dec 1-15;68(1-2):211-20.
- 14) Laura L. Baxter, Timothy H. Moran, Joan T. Richtsmeier, Juan Troncoso, Roger H. Reeves. Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Human Molecular Genetics*. 2000 Jan 9;2:195-202.
- 15) Altafaj X, Dierssen M, Baamonde C, Martí E, Visa J, Guimerà J, Oset M, González JR, Flórez J, Fillat C, Estivill X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001 Sep 1;10(18):1915-23.
- 16) Valenti D, Stagni F, Emili M, Guidi S, Bartesaghi R, Vacca RA. Impaired Brain Mitochondrial Bioenergetics in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome Is Restored by Neonatal Treatment with the Polyphenol 7,8-Dihydroxyflavone. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Dec 28;11(1):62.
- 17) Lockrow J, Prakasam A, Huang P, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Granholm AC. Cholinergic degeneration and memory loss delayed by vitamin E in a Down syndrome mouse model. *Exp Neurol*. 2009 Apr;216(2):278-89.
- 18) Giacomini A, Stagni F, Trazzi S, Guidi S, Emili M, Brigham E, Ciani E, Bartesaghi R. Inhibition of APP gamma-secretase restores Sonic Hedgehog signaling and neurogenesis in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol Dis*. 2015 Oct;82:385-396.
- 19) Rueda N, Vidal V, Garcia-Cerro S, Narcis JO, Llorens-Martin M, Corrales A, Lantigua S, Iglesias M, Merino J, Merino R, Martinez-Cue C. Anti-IL17 treatment ameliorates Down syndrome phenotypes in mice. *Brain Behav Immun*. 2018 Oct;73:235-251.
- 20) Altman J, Bayer S (1975) Postnatal development of the hippocampal dentate gyrus under normal and experimental conditions. In: *The Hippocampus*, Vol. 1. RL Isaacson, KH Pribram (eds), pp. 95–122. Plenum Press: New York and London.
- 21) Brazel CY, Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Prog Neurobiol*. 2003 Jan;69(1):49-69.
- 22) Bianchi P, Ciani E, Guidi S, Trazzi S, Felice D, Grossi G, Fernandez M, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi R. Early pharmacotherapy restores neurogenesis and cognitive performance in the Ts65Dn mouse model for Down syndrome. *J Neurosci*. 2010 Jun 30;30(26):8769-79.

- 23) Guidi S, Stagni F, Bianchi P, Ciani E, Giacomini A, De Franceschi M, Moldrich R, Kurniawan N, Mardon K, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi R. Prenatal pharmacotherapy rescues brain development in a Down's syndrome mouse model. *Brain*. 2014 Feb;137(Pt 2):380-401.
- 24) Stagni F, Magistretti J, Guidi S, Ciani E, Mangano C, Calzà L, Bartesaghi R. "Pharmacotherapy with fluoxetine restores functional connectivity from the dentate gyrus to field CA3 in the Ts65Dn mouse model of down syndrome". *PLoS One*. 2013; 19;8(4).
- 25) Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Ciani E, Bartesaghi R. "Timing of therapies for Down syndrome: the sooner, the better". *Front Behav Neurosci*. 2015; 6;9:265.
- 26) Stagni F, Giacomini A, Emili M, Trazzi S, Guidi S, Sassi M, Ciani E, Rimondini R, Bartesaghi R. "Short- and long-term effects of neonatal pharmacotherapy with epigallocatechin-3-gallate on hippocampal development in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome". *Neuroscience*. 2016; 1;333:277-301.
- 27) Stagni F, Raspanti A, Giacomini A, Guidi S, Emili M, Ciani E, Giuliani A, Bighinati A, Calzà L, Magistretti J, Bartesaghi R. "Long-term effect of neonatal inhibition of APP gamma-secretase on hippocampal development in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome". *Neurobiol Dis*. 2017; 103: 11-17.
- 28) Stagni F, Salvalai M.E., Giacomini A., Emili M., Uguagliati B., Xia E., Grilli M., Bartesaghi R., Guidi S. "Neonatal treatment with cyclosporine A restores neurogenesis and spinogenesis in the Ts65Dn model of Down syndrome". *Neurobiol Dis*. 2019;129 44-55.
- 29) Wilson SJ, Cavanagh CC, Leshner AM, Frey AJ, Russell SE, Smyth EM. Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. *J Lipid Res*. 2009;50(6):1047-1056.
- 30) Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Doré V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K. High performance plasma amyloid- $\beta$  biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*. 2018 Feb 8;554(7691):249-254.
- 31) Jiang Y, Sato Y, Im E, Berg M, Bordi M, Darji S, Kumar A, Mohan PS, Bandyopadhyay U, Diaz A, Cuervo AM, Nixon RA. Lysosomal Dysfunction in Down Syndrome Is APP-Dependent and Mediated by APP- $\beta$ CTF (C99). *J Neurosci*. 2019 Jul 3;39(27):5255-5268.
- 32) Antonarakis SE, Skotko BG, Ruffi MS, Strydom A, Pape SE, Bianchi DW, Sherman SL, Reeves RH. Down syndrome. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Feb 6;6(1):9.
- 33) Evin G, Li QX. Platelets and Alzheimer's disease: Potential of APP as a biomarker. *World J Psychiatry*. 2012 Dec 22;2(6):102-13.
- 34) Donner L, Fälker K, Gremer L, Klinker S, Pagani G, Ljungberg LU, Lothmann K, Rizzi F, Schaller M, Gohlke H, Willbold D, Grenegard M, Elvers M. Platelets contribute to amyloid- $\beta$  aggregation in cerebral vessels through integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-induced outside-in signaling and clusterin release. *Sci Signal*. 2016 May 24;9(429):ra52.
- 35) Shineman DW, Zhang B, Leight SN, Pratico D, Lee VM. Thromboxane receptor activation mediates isoprostane-induced increases in amyloid pathology in Tg2576 mice. *J Neurosci*. 2008 Apr 30;28(18):4785-94.
- 36) Trazzi S, Mitrugno VM, Valli E, Fuchs C, Rizzi S, Guidi S, Perini G, Bartesaghi R, Ciani E. APP-dependent up-regulation of Pthch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 15;20(8):1560-73.
- 37) Busciglio J, Pelsman A, Wong C, Pigino G, Yuan M, Mori H, Yankner BA. Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron*. 2002 Feb 28;33(5):677-88.
- 38) Butterfield DA, Boyd-Kimball D. Redox proteomics and amyloid  $\beta$ -peptide: insights into Alzheimer disease. *J Neurochem*. 2019 Nov;151(4):459-487.
- 39) Perluigi M, Di Domenico F, Butterfield DA. Unraveling the complexity of neurodegeneration in brains of subjects with Down syndrome: insights from proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2014 Feb;8(1-2):73-85.
- 40) Yan A, Zhang T, Yang X, Shao J, Fu N, Shen F, Fu Y, Xia W. Thromboxane A2 receptor antagonist SQ29548 reduces ischemic stroke-induced microglia/macrophages activation and enrichment and ameliorates brain injury. *Sci Rep*. 2016 Oct 24;6:35885.
- 41) Garcia O, Flores-Aguilar L. Astroglial and microglial pathology in Down syndrome: Focus on Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*. 2022 Sep 20;16:987212.

## Piano di Formazione Scientifica

Il progetto prevede un piano di formazione scientifica mirato a fornire gli strumenti di carattere teorico e pratico, necessari per il raggiungimento degli obiettivi del progetto.

Dal punto di vista pratico, nel progetto verranno acquisite le seguenti metodologie sperimentali:

- Mantenimento di colonie di topi transgenici e genotipizzazione con varie metodiche
- Manipolazione di animali per trattamenti farmacologici
- Perfusione trans-cardiaca e prelievo di tessuto cerebrale
- Sezione di tessuto cerebrale tramite criostato e montaggio delle fettine su vetrino
- Tecniche di colorazione istologica di base (Nissl, Golgi)
- Tecniche di immunoistochimica su fettine montate e fluttuanti
- Acquisizione computerizzata di immagini di preparati istologici al microscopio ottico, a fluorescenza e confocale

- Impiego di vari software per l'analisi stereologica di diverse regioni cerebrali (stima del numero di neuroni), per la ricostruzione dell'albero dendritico, per la quantificazione delle spine dendritiche e per la quantificazione dei terminali sinaptici
- Estrazione di proteine da campioni di tessuto cerebrale per analisi tramite western blot
- Estrazione di mitocondri per l'analisi dello stress ossidativo e della produzione di ATP
- Analisi comportamentali del neurosviluppo, riflesso di raddrizzamento, cliff aversion, negative geotaxis, forelimb grasp
- Analisi comportamentale mirata a saggiare funzioni di memoria e apprendimento tramite i seguenti test: Morris Water Maze, Passive avoidance
- Impiego di test statistici di base per confronti multipli fra gruppi sperimentali.

Dal punto di vista strettamente teorico il progetto di formazione prevede:

- Frequenza a seminari tenuti nel dipartimento presso il quale verrà svolto il piano di formazione. I seminari saranno tenuti sia da docenti del dipartimento sia da studiosi nazionali ed internazionali
- Partecipazione a Congressi scientifici nazionali ed internazionali.

Nell'ambito del progetto, saranno elementi caratterizzanti della formazione dell'assegnista l'acquisizione di autonomia nell'organizzazione ed esecuzione degli esperimenti e nella elaborazione ed interpretazione dei dati.