

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI INGEGNERIA ED ARCHITETTURA

Corso di studio in Ingegneria Biomedica

***INTERFACCE NANOSTRUTTURATE, DISPOSITIVI OTTICI ED
ELETTRONICI PER LO STUDIO DELLA FISIOLOGIA DI
CELLULE CEREBRALI NON NEURONALI***

Tesi Sperimentale

Tesi di laurea in Fisiologia

**Presentata da:
Marco Padovan**

**Relatore:
Dott.ssa Valentina Benfenati**

**Matricola n°:
0000730737**

**Correlatrice:
Dott.ssa Emanuela Saracino**

Sessione I

Anno accademico 2017/2018

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 LE CELLULE DEL SISTEMA NERVOSO.....	5
1.1.1 Classificazione funzionale del Sistema Nervoso Centrale: le cellule eccitabili.....	5
1.1.2 Impulso nervoso e conduzione del potenziale d'azione nei neuroni.....	6
1.1.4 Classificazione della glia.....	10
1.2 GLI ASTROCITI.....	11
1.2.1 Storia.....	11
1.2.2. Classificazione morfologica degli astrociti.....	13
1.2.3 Gli astrociti ed il processo evolutivo.....	16
1.3 FUNZIONI FISILOGICHE DEGLI ASTROCITI.....	18
1.3.1 Gli astrociti e l'omeostasi cerebrale.....	18
1.4 LA MODULAZIONE SINAPTICA ASTROGLIALE E LA SINAPSI TRIPARTITICA.....	25
1.5 MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLE FUNZIONI FISILOGICHE DEGLI ASTROCITI.....	27
1.5.1 I canali ionici espressi in astrociti.....	27
1.5.2 Acquaporine.....	33
1.5.3 Segnali di calcio astrogliali: oscillazioni ed onde di calcio.....	36
1.6 ASTROCITI E FISIOPATOLOGIE.....	41
1.7 METODOLOGIE DI STUDIO DELLA FISIOLOGIA DEGLI ASTROCITI: LO STATO DELL'ARTE.....	47
1.7.1 Colture cellulari.....	47
1.7.2 La tecnica del patch-clamp.....	49
1.7.3 Registrazione extracellulare.....	52
1.7.4 Calcium imaging.....	54
2 SCOPO DELLA RICERCA.....	61
3 MATERIALI E METODI.....	63
3.1 COLTURE PRIMARIE DI ASTROCITI CORTICALI DI RATTO.....	63
3.1.1 La piastratura di astrociti.....	64
3.2 TEST DI VITALITA' CELLULARE: FDA ED ALAMAR BLUE.....	65
3.3 IMMUNOFLOURESCENZA E MICROSCOPIA FLUORESCENTE.....	67
3.4 ANALISI WESTER BLOT.....	68
3.5 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE.....	68
4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	70
4.1 IDROTALCITI.....	70

4.2 FILM NANOSTRUTTURATI INDUCONO IL DIFFERENZIAMENTO DEGLI ASTROCITI IN VITRO.....	72
4.3 LA CRESCITA DI ASTROCITI SU SUBSTRATI NANOSTRUTTURATI INDUCE L'ESPRESSIONI DI CANALI IONICI E ACQUAPORINE SULLA MEMBRANA DEGLI ASTROCITI	75
4.4 NANOFILI DI SILICIO	78
4.5 INTERAZIONE DI GRAFENE BIOMIMETICO CON CELLULE NEURALI	81
5 CONCLUSIONI	85
6 RINGRAZIAMENTI	86
7 BIBLIOGRAFIA	88

La scienza ci dice ciò che possiamo sapere, ma ciò che possiamo sapere è poco, e se dimentichiamo quanto non possiamo sapere diventiamo insensibili a molte cose di grandissima importanza.

(Bertrand Russell)

1 INTRODUZIONE

1.1 LE CELLULE DEL SISTEMA NERVOSO

1.1.1 Classificazione funzionale del Sistema Nervoso Centrale: le cellule eccitabili

Il sistema nervoso centrale (SNC) è formato principalmente da due tipologie di cellule: quelle eccitabili, ovvero i neuroni, e quelle non eccitabili, ovvero le cellule gliali.

Le cellule neuronali svolgono un ruolo di vitale importanza all'interno del SNC occupandosi di integrare le informazioni che derivano dalle branche afferenti del sistema nervoso periferico (SNP), e stabilendo un'eventuale risposta a livello degli organi. I neuroni costituiscono l'unità funzionale del sistema nervoso, si presentano con una morfologia particolare: il corpo cellulare, detto *soma*, quale costituisce il "centro di controllo" del neurone, da esso dipartono lunghi processi chiamati *dendriti*, se ricevono segnali da cellule vicine per portarle al corpo centrale, il cui numero, forma, ed estensione risulta essere variabile da cellula a cellula, oppure *assoni*, se invece svolgono il compito di trasmettere segnali in uscita verso altri neuroni o verso gli organi bersaglio. A differenza per quanto succede con i dendriti, i neuroni presentano solo un assone.

I neuroni possono essere classificati in base alla loro struttura, o alla loro funzione, dal punto di vista strutturale si suddividono in: *pseudounipolari*, se assone e dendriti si uniscono creando un unico processo, *bipolari*, se invece possiedono un solo dendrite e un solo assone, *multipolari*, se sono privi di un assone principale identificabile.

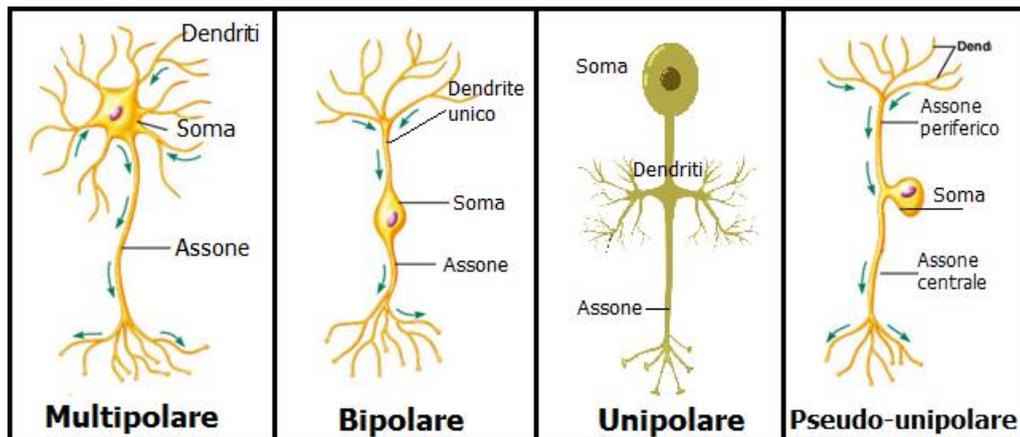


Figura 1 Schematizzazione delle varie tipologie di neuroni all'interno del SNC tratto da *Fisiologia Umana*, Silverthorn D.U., 2010

Dal punto di vista funzionale, invece, i neuroni vengono definiti in: *sensoriali* (o afferenti), il cui compito è quello di condurre informazioni sugli stimoli derivanti dai recettori sensoriali al SNC, *interneuroni*, che si occupano della trasmissione dei segnali tra cellule, e neuroni *efferenti*, i quali si suddividono a loro volta in *motori somatici*, se con i loro segnali si occupano di controllare la muscolatura scheletrica, o neuroni *autonomici*, se invece controllano quella liscia e del miocardio.

1.1.2 Impulso nervoso e conduzione del potenziale d'azione nei neuroni

Le cellule del sistema nervoso, come tutte le cellule del nostro organismo, sono polarizzate, ovvero esiste una differenza di potenziale detta potenziale di membrana tra i due versanti della membrana plasmatica. Il potenziale di membrana a riposo è un fenomeno dovuto fondamentalmente a due fattori: 1) il gradiente di concentrazione degli ioni ai due lati della membrana plasmatica, dovuto alla diseguale distribuzione della concentrazione di ioni quali lo ione Calcio (Ca^{2+}), Sodio (Na^+) e Potassio (K^+) nei compartimenti intra ed extracellulare. Calcio e Sodio sono infatti più concentrati nel liquido extracellulare piuttosto che nel citoplasma, mentre gli ioni potassio (K^+) sono più concentrati nello spazio intracellulare. In accordo con la legge di diffusione, il gradiente di concentrazione genera una forza elettromotrice che promuove un flusso transmembranario di ioni. Il transito degli ioni attraverso la

membrana è tuttavia fortemente influenzato dalla permeabilità della membrana cellulare agli ioni stessi. Pertanto, è stato definito che il gradiente di concentrazione e di permeabilità di membrana determinano il valore del *potenziale di membrana* che, a riposo, nei neuroni ha un valore pari a ~ -70 mV. Tuttavia, variazioni del potenziale di membrana si verificano continuamente nelle cellule neuronali. In particolare, quando la membrana plasmatica neuronale aumenta la sua permeabilità al Na^+ , il Na^+ entra nella cellula e il valore del potenziale di membrana aumenta conseguentemente, un fenomeno detto depolarizzazione. Se invece si verifica una modifica nella permeabilità della membrana plasmatica allo ione K^+ si avrà una diminuzione del potenziale di membrana, e in questo caso si parla di *iperpolarizzazione*. Essendo gli ioni particelle cariche e fortemente idrofile, non possono attraversare passivamente la membrana plasmatica. Pertanto, le variazioni di permeabilità agli ioni e quindi variazioni del potenziale di membrana, dipendono strettamente dalla funzione di proteine transmembrana che formano canali ionici e trasportatori.

I canali ionici possono essere classificati in base agli ioni che fluiscono attraverso di essi: i canali Na^+ , i canali K^+ , i canali Ca^{2+} , e i canali Cl^- , o in base alle loro proprietà di apertura (dette proprietà di “gating”). Ad esempio, i neuroni presentano dei canali ionici a voltaggio dipendente, che hanno la caratteristica di passare dallo stato di chiusura a quello di apertura permettendo il transito degli ioni, in funzione del voltaggio della membrana plasmatica. In seguito all'apertura dei canali ionici, gli ioni possono entrare o uscire dalla cellula generando così un flusso di carica ionica detta *corrente di ione* (I_{ione}) che genera un segnale elettrico in grado di depolarizzare o iperpolarizzare la cellula. È importante sottolineare che, variazioni di potenziale di membrana si verificano in tutte le cellule del sistema nervoso e del nostro organismo, non solo nei neuroni. I segnali ionoelettrici generati dai flussi ionici transmembrana si possono classificare in: *potenziali graduati*, che sono variazioni di potenziale di intensità variabile comunicazione che si propagano per breve distanza (pochi μm), in quanto a causa della dispersione di corrente e della resistenza del citoplasma diminuiscono di intensità. I *potenziali d'azione*, sono generati da un potenziale graduato o dalla somma di più potenziali graduati in grado che arriva nella zona trigger del neurone, questi si propagano per grandi distanze in

maniera molto rapida. Il rapido spostamento di un potenziale d'azione lungo l'assone viene chiamato "conduzione del potenziale d'azione", e questo meccanismo sta alla base della trasmissione degli impulsi elettrici tra i neuroni, permettendo quindi la comunicazione tra le varie parti del SNC, e quella tra il cervello e midollo spinale con il resto del corpo.

I potenziali d'azione vengono definiti come "fenomeni del tutto o del nulla", poiché se si presentano, lo fanno con una depolarizzazione massima, generando un picco che arriva fino a 30 mV.

Per riuscire a generare un potenziale d'azione è necessario che un potenziale graduato quando raggiunga la cosiddetta "zona di trigger", ovvero il monticolo assonico consentendo di portare il potenziale di membrana ad un valore superiore al valore di $\sim -55\text{mV}$, definito come "potenziale soglia". Infatti, a questo valore si verifica l'apertura di tutti i canali Na^+ voltaggio dipendenti. Quando un potenziale graduato non consente di raggiungere questo valore allora si definisce come potenziale sottosoglia e il potenziale graduato si esaurirebbe esaurisce in breve tempo (pochi ms).

La curva del potenziale d'azione si presenta come una simil-gaussiana, la quale può essere divisa in 3 fasi: ascendente, discendente, iperpolarizzazione postuma. Il tratto ascendente si presenta in una crescita del potenziale di membrana dovuto all'aumento di permeabilità della cellula al Na^+ , quando il potenziale graduato arriva alla zona trigger con un potenziale pari al valore di quello soglia (-55 mV) i canali del Na^+ si aprono, permettendo a questo ione di entrare nel neurone a causa del gradiente elettrico (interno della cellula negativo, esterno invece positivo) e di concentrazione (concentrazione degli ioni Na^+ maggiore all'esterno della cellula rispetto all'interno) che vi è a cavallo della membrana. Così facendo avviene la depolarizzazione della membrana, che causa un aumento del potenziale portandolo a valori sempre più positivi. Non appena il potenziale passa per il valore di 0 V , il gradiente elettrico che attraeva gli ioni sodio all'interno della cellula viene meno, causando un minor spinta all'entrata dello stesso ione, che comunque continua ad entrare a causa del gradiente di concentrazione. Al contempo, inoltre, iniziano ad aprirsi i canali voltaggio dipendenti del K^+ , la cui apertura risulta essere più lenta rispetto a quelli del Na^+ . Una volta giunti al picco della curva ($+30\text{ mV}$) i canali del K^+ sono aperti, mentre quelli del Na^+ si chiudono. A

questo punto alla inizia la seconda fase detta di ripolarizzazione, in cui grazie all'apertura dei canali del potassio e al gradiente sia chimico che elettrico, questo ione è in grado di uscire dalla cellula e quindi di riportare il potenziale

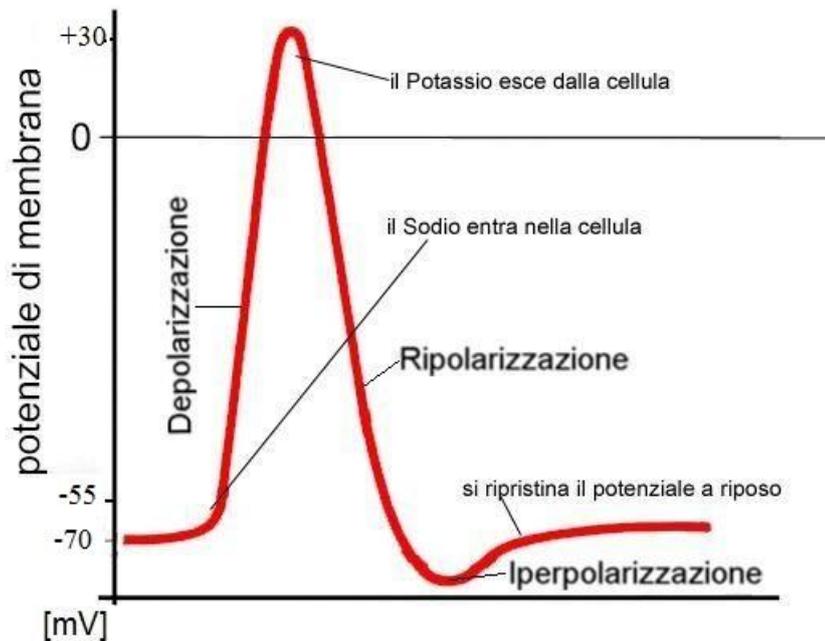


Figura 2 Schematizzazione della trasmissione del potenziale d'azione tratto da *Fisiologia Umana*, Silverthorn D.U., 2010

di membrana al suo valore iniziale (-70 mV). Arrivati a questo valore inizia la chiusura dei canali del potassio, che essendo più lenti come precedentemente detto, portano comunque una fuoriuscita dello ione che induce il potenziale d'azione a decrescere fino ad un valore di -90 mV; con la chiusura definitiva di questi canali tramite la ritenzione di K^+ e la penetrazione di Na^+ si ristabilisce il potenziale di membrana al suo valore di riposo (-70 mV), quest'ultima fase viene detta *iperpolarizzazione postuma*.

1.1.3 Classificazione funzionale del Sistema Nervoso Centrale: le cellule non eccitabili: la glia

Le cellule gliali, o neuroglia, sono le cellule più numerose del sistema nervoso (SN). Se inizialmente erano state definite come cellule collante del cervello, (glia=glue=colla), gli studi degli ultimi quaranta anni hanno dimostrato come la glia non fornisca solo un ruolo di supporto strutturale alle cellule neuronali, bensì gioca sia un ruolo cruciale anche del mantenimento dell'omeostasi

dell'ambiente cerebrale in condizioni sia fisiologiche che patologiche, sia influenza direttamente la capacità di trasmissione degli impulsi neuronali.

1.1.4 Classificazione della glia

Le cellule gliali sono classificate in base al ruolo che svolgono e alla loro morfologia in: macroglia e microglia. La prima categoria si suddivide a sua volta in tre tipologie: oligodendrociti, cellule ependimali ed astrociti.

Gli oligodendrociti risiedono nella sostanza bianca, sono dotati di numerosi prolungamenti e rivestono gli assoni del SNC, formando cerchi concentrici e determinando la *guaina mielinica*, composta prevalentemente da lipidi. Il ruolo della *guaina mielinica* che avvolge l'*assone* è quello di isolare elettricamente la sua superficie esterna della membrana neuronale, permettendo così una trasmissione del segnale neuronale notevolmente più rapida.

Le cellule ependimali, invece, hanno forma cilindrica o tutt'al più cubica, si presentano in gruppi di cellule ammassate l'una alle altre per formare uno strato di tessuto protettivo monostratificato presente nelle cavità del cranio (ventricoli) e del midollo spinale (canale ependimale). Svolgono principalmente un ruolo nel riassorbimento del liquido cerebrospinale presente nel SNC filtrandolo e permettendone, quindi, il ricambio e lo scambio con le cellule vascolari (Silverton D.U., 2010). Grazie infatti alla loro localizzazione a livello dei capillari fenestrati del plesso coroideo formano un sincizio tramite cui avviene lo scambio metabolico tra sangue e liquido cerebrospinale.

Gli astrociti sono la tipologia di cellule gliali più numerose nell'organismo cervello umano, queste hanno una morfologia stellata con un copro cellulare da cui si dipartono numerosissimi prolungamenti. Essendo gli astrociti le cellule su cui è incentrato il presente lavoro di tesi alla loro anatomia e funzione sarà dedicato un capitolo successivo.

Le cellule della microglia si occupano della difesa immunitaria del SNC svolgendo il ruolo di difesa specializzata dell'ambiente neurale. Data la mancanza di anticorpi, queste cellule devono essere in grado di riconoscere i corpi estranei o le cellule danneggiate e fagocitarle in condizioni fisiologiche, queste presentano una morfologia con un soma allungato, dal quale dipartono

numerosi prolungamenti filamentosi; al contrario, in condizioni patologiche, la microglia appare tipicamente rotondeggiante e viene detta microglia reattiva. Il ruolo patofisiologico della microglia è stato molto studiato e appare ormai chiaro come la reattività microgliale abbia un ruolo causale in malattie neurodegenerative, quali ad esempio il morbo di Lou Gherig (comunemente detto SLA, ovvero Sclerosi Laterale Amiotrofica) (Rao & Weiss, 2004) o la malattia di Alzheimer (Inserire referenza).

1.2 GLI ASTROCITI

1.2.1 Storia

La maggioranza dei ricercatori si è da sempre soffermata sullo studio del neurone, considerandolo, come singola unità indipendente del sistema nervoso, (*dottrina dei neuroni*), tra questi è da registrare il notevole contributo che diedero Jan Purkinje, Gabriel Valentin, Robert Remak e Robert Bentley Todd tra il 1836 e il 1845.

Quasi mezzo secolo più tardi, nel 1886, Wilhelm His, Fridtjof Nansen e Auguste Forel pubblicarono in modo indipendente un elaborato che anticipava la suddetta dottrina, pubblicata da Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz, di un anno. Questi tre ricercatori sono riusciti a dedurre conclusioni simili a quelle pubblicate da Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz, nonostante le diverse metodologie, come la degenerazione retrograda e lo sviluppo di cellule nervose.

A partire dalla seconda metà dell'Ottocento, esattamente nel 1856, grazie al patologo Rudolf Virchow, fu introdotto nelle neuroscienze per la prima volta il termine *Neuroglia* ("*Nervenkitt*"), si voleva esprimere "la sostanza connettiva, presente nel cervello, nel midollo spinale e nei nervi sensoriali superiori, una sorta di "*Nervenkitt*" in cui sono incorporati gli elementi del sistema nervoso" (Virchow R., 1856). Così, tramite questo termine, Virchow pensava alla neuroglia come un vero e proprio tessuto connettivo di supporto ai neuroni (Virchow R., 1856). Questo concetto di neuroglia come tessuto connettivo fornì la motivazione per considerare le glia come un attore secondario e solo di supporto ai neuroni. Successivamente, grazie all'apporto del lavoro di Camillo

Golgi nel 1870, ci fu la prima descrizione delle caratteristiche degli astrociti e degli oligodendrociti, tramite le prime osservazioni istologiche approfondite sulle neuroglia, Golgi riuscì a descrivere i contatti tra cellule gliali e vasi sanguigni, definendoli come “pedicelli terminali” (“endfeet”) (Golgi, 1873). Sulla base di questi risultati, Golgi teorizzò che le cellule gliali fornissero il supporto metabolico per i neuroni tramite lo scambio di varie sostanze, concetto che rimane valido tutt’oggi (Golgi, 1873).

Il termine “astrociti” venne introdotto nella storia delle neuroscienze per la prima volta nel 1891 da Michael von Lenhossek,

La prima classificazione di astrociti come *protoplasmatici*, risiedenti nella materia grigia, e *fibrosi*, situati nella materia bianca, avvenne grazie alla ricerca di Kolliker e Andriezen rispettivamente nel 1889 e 1893 (Andriezen, 1893). Tuttavia, l’ipotesi più importante, quella che sottolinea e descrive meglio il lavoro della ricerca sugli astrociti, fu quella fatta da Carl Ludwig Schleich nel 1894, il quale ipotizzò per la prima volta che le interazioni glia-neuroni fossero importanti per le funzioni cerebrali, teorizzando anche che tali interazioni determinassero lo stato di eccitazione del SNC (Schleich, 1894). Un’ipotesi premonitrice di questo fatto derivò anche dal lavoro di Ernesto Lugaro, che fu il primo a proporre che uno dei ruoli degli astrociti fosse quello di assorbire e metabolizzare i neurotrasmettitori di quelle che lui definiva “articolazioni neuronali”, ovvero le *sinapsi* (Lugaro, 1907). Ciò venne confermato sperimentalmente solo nel 1994 da Mennerick e Zorumski, che grazie al loro lavoro dimostrarono come i trasportatori di glutammato negli astrociti sono i responsabili di circa il 90% della ricaptazione di questa molecola dallo spazio extracellulare (Mennerick, Zorumski, 1994).

Tra il 1897 e il 1904, Santiago Ramón y Cajal respinse l’idea di Golgi secondo cui la glia un ruolo nelle funzioni nutritive del SNC in virtù del contatto sia con i capillari che con i neuroni, e rifiutò la “teoria del riempimento” di Weigert, secondo cui le cellule glia risultano essere completamente passive, e addette al solo riempimento, appunto, della scatola cranica, ipotizzò invece la “teoria dell’isolamento”, secondo cui gli astrociti fungevano da isolamento fisico.

L’età moderna della fisiologia delle cellule gliali è iniziata con diverse scoperte avvenute a cavallo tra gli anni ’50 e ’70.

Walter Hild, nel 1958, dimostrò che le proprietà elettrofisiologiche di astrociti coltivati fossero diverse da quelle dei neuroni con esperimenti di recording su microelettrodi (Hild W., 1958). Leif Hertz sottolineò, invece, il notevole ruolo delle glia nell'assorbimento del K^+ extracellulare rilasciato dai neuroni attivi.

Solo grazie alla collaborazione di Stephen Kuffler con David Porter nel 1964 si dimostrò come le cellule gliali avessero un potenziale di membrana a riposo inferiore ai neuroni, spiegando, inoltre, come queste non generassero potenziali d'azione (Kuffler S., Porter D., 1964). Successivamente, nel 1966, lavorando con Richard Oarkand e John Nicholls, Kuffler si dimostrò l'accoppiamento elettrico tra cellule gliali (Kuffler S, Nicholls J., Oarkand R, 1966). Gli esperimenti condotti da questo gruppo di ricercatori portarono alla formulazione dell'ipotesi di buffer spaziali di K^+ .

Nel 1969 Milton Brightman e Tom Reese scoprirono per la prima volta le “gap junction”.

Nel 1984, grazie al gruppo di ricerca di Kattenmann e Harold Kimelberg sono stati identificati i recettori del glutammato e del GABA sia negli astrociti che negli oligodendrociti.

Dunque, gli astrociti risultano essere attori protagonisti nella trasmissione dei segnali neuronali, negli anni '90 Ann Cornell-Bell, scoprì il metodo di comunicazione degli astrociti, ovvero la propagazione delle onde di Ca^{2+} , e di Maiken Nedergaard, Philip Haydon e Vladimir Parpura, i quali scoprirono che gli astrociti possono stimolare l'aumento del Ca^{2+} nei neuroni adiacenti se in coltura (Nedergaard M. et al, 1994).

Ulteriori ricerche ed esperimenti sono state svolte, e molte hanno indicato che gli astrociti esprimono una moltitudine di recettori dei neurotrasmettitori e dei canali ionici e dell'acqua.

1.2.2. Classificazione morfologica degli astrociti

Come detto in precedenza (vedi capitolo “Classificazione della glia”) gli astrociti si suddividono in fibrosi e protoplasmatici in base alla loro morfologia e collocazione all'interno del SNC. I primi, presentandosi con una morfologia stellata, possiedono numerose diramazioni tutt'al più cilindriche che si irradiano

dal soma cellulare terminando sui capillari. Questi processi risultano essere molto lunghi con poche, o talvolta anche nulle, ramificazioni intermedie. Gli astrociti fibrosi risiedono nella sostanza bianca e risultano avere un nucleo di forma ovale in cui la cromatina si distribuisce uniformemente. Gli appartenenti alla seconda categoria, invece, risultano essere a forma stellata come i fibrosi, distinguendosi da questi per la lunghezza dei propri processi, che risultano essere più corti, e più ramificati, formando dei foglietti membranosi nei pressi del corpo cellulare dei neuroni e attorno agli assoni neuronali. Gli astrociti protoplasmatici si trovano nella sostanza grigia e alcuni di questi formano delle placche terminali sulla superficie della meninge pia madre. Analizzando il citoplasma di entrambe le categorie è da registrare come questo non cambi in maniera notevole dai fibrosi rispetto ai protoplasmatici, infatti all'interno delle cellule si presentano granuli di glicogeno e microtubuli piuttosto concentrati, anche se quelli presenti negli astrociti protoplasmatici risultano essere maggiormente sviluppati. Questa caratteristica denota un notevole proprietà degli astrociti, ovvero la capacità di fungere come fonte di riserva energetica per i neuroni nei quali le riserve di substrati per la produzione di ATP sono tutt'al più inesistenti. Grazie al ciclo glicolitico e alla conversione del piruvato in lattato da parte dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH5), gli astrociti sono in grado di fornire ATP ai neuroni con cui sono a contatto (Bittar, Martin, & Magistretti, 1998).

Altre due categorie di astrociti sono stati identificati e a partire dal 2009, gli astrociti interlaminari e gli astrociti a proiezione varicosa (Oberheim et al., 2009).

I primi sono presenti nel primo strato della corteccia cerebrale e si presentano con corpi cellulari sferoidali da cui si estendono ramificazioni tortuose non particolarmente estesi, non presentando al termine di queste alcuna varicosità. Inoltre, alcune diramazioni di questa tipologia di astrociti si propagano fino alla zona II-IV della corteccia. Nonostante non sia stato definito un preciso significato funzionale a questa tipologia di astrociti, è stato dimostrato come questi forniscano un supporto alla trasmissione delle onde di calcio, ricavandosi un ruolo d'importanza anche nella trasmissione di segnali a lunga distanza.

Gli astrociti a proiezione varicosa sono localizzati negli strati V-VI della corteccia cerebrale, caratterizzati da processi piuttosto lineari la cui lunghezza è di 1-5 mm, e al cui termine sono presenti varicosità, uniformemente distribuite e distanziate di 10 μm l'una dall'altra, che culminano nel neuropilo o sui vasi sanguigni tramite contatto diretto con le pareti dei vasi (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017). Come per gli astrociti interlaminari, anche per questa tipologia la funzione specifica rimane sconosciuta, la presenza di queste varicosità fa pensare che potrebbero rappresentare una compartimentazione delle componenti subcellulari per consentire la comunicazione a lunga distanza attraverso le zone corticali e tra materia bianca e grigia (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017).

Un'altra distinzione utile per classificare i vari astrociti che è riscontrabile analizzando il citoplasma delle due categorie di astrociti, infatti il numero di gliofibrille è più numeroso negli astrociti fibrosi rispetto a quelli protoplasmatici. Queste strutture fibrillari sono composte da gliofilamenti più piccoli, costituiti da subunità globulari, e sono costituite dalla proteina gliale acida (GFAP), il più rilevante e utilizzato marker astrocitario sia in vivo che in situ.

Purtroppo, però questa classificazione, nonostante sia accettata, risulta limitante in quanto le differenze morfologiche non sono sempre evidenti e nette.

È da sottolineare come gli astrociti in vitro siano morfologicamente e strutturalmente, nonché funzionalmente diversi da quelli in situ. In quest'ottica le cellule astrogliali in vitro sono classificate in due tipi: tipo 1 e 2 (Cameron & Rakic, 1991). Dal punto di vista morfologico, le cellule di tipo 1 si presentano con una forma poligonale piatta senza processi che dipartono dal soma, che risulta essere di dimensione maggiore, mentre gli astrociti di tipo 2, hanno un corpo cellulare più piccolo presentando però numerose diramazioni. Gli astrociti di tipo 2 non risultano essere presenti in vivo, denotando che queste derivino da una variazione di altre cellule presenti nel cervello (NG2) e prodotte dalle condizioni di coltura cellulare (Robert H Miller & Raff, nel 1984).

Purtroppo, però anche questa classificazione può risultare troppo schematica e non assolutamente veritiera, infatti per cellule gliali provenienti da altre regioni del SNC diverse dal nervo ottico la morfologia risulta essere ancora diversa.

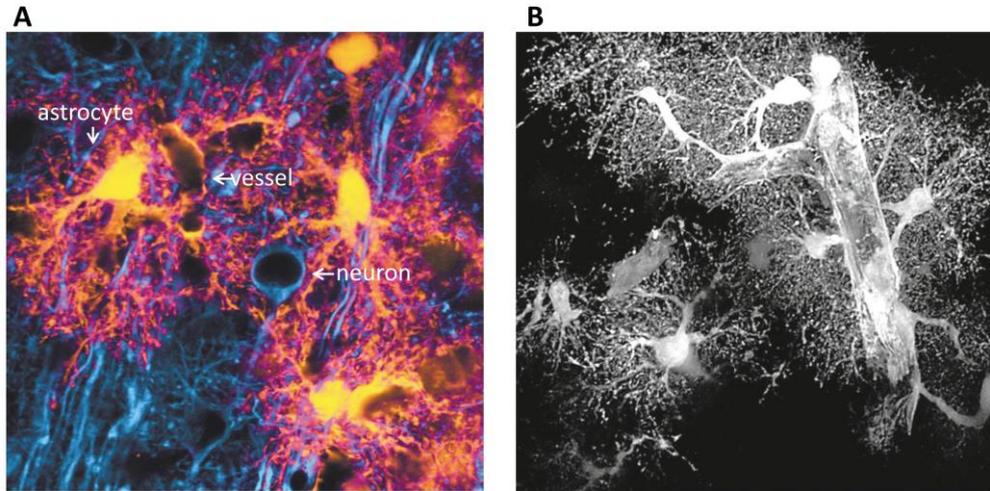


Figura 3 A) Immagine di marcatura immunofluorescente di un astrocita in vivo marcato con GFAP e di un neurone marcato con b-tubulina. B) Immagine di ricostruzione di microscopia confocale che sottolinea l'intima interazione tra astrociti e vasi sanguigni. A: tratto da Nedergaard et al., *Elsevier*, 2003; B tratto da Obeheim et al., *The Journal of Neuroscience*, 2009)

1.2.3 Gli astrociti ed il processo evolutivo

Diverse risultano essere le prove che gli astrociti del cervello umano sono anatomicamente differenti da quelle del cervello di altre specie. A partire dagli studi morfologici condotti nell'Ottocento, è emerso un consenso da parte della ricerca neuroscientifica sul fatto che gli astrociti umani risultino essere più complessi di quelli presenti nei roditori, risultando inoltre maggiormente coinvolti nell'elaborazione delle informazioni. Questo è dovuto alle differenze intrinseche nei metodi di segnalazione del calcio e nei processi metabolici. Grazie al progresso degli studi sulla fisiologia neurogliale, la scoperta delle differenze morfologiche e funzionali tra astrociti umani e roditori sta diventando un argomento sempre più importante. Ulteriori studi sugli astrociti umani sono stati sviluppati utilizzando avanzate tecniche di imaging, permettendo così di differenziare queste cellule cerebrali umane in quattro

categorie: astrociti interlaminari, astrociti protoplasmatici, astrociti fibrosi e astrociti a proiezione varicosa (Oberheim et al., 2009).

Una delle più importanti differenze tra il cervello dei primati e quello degli altri mammiferi risultano essere gli astrociti interlaminari. Inoltre, è stata osservata una differenza nella morfologia di questo di astrociti tra i primati e l'uomo, in quanto in quest'ultimo sono caratterizzati da corpi cellulari sferoidali dai quali dipartono diversi processi di breve lunghezza (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017), il significato funzionale di questa discrepanza però risulta essere sconosciuto (Colombo & Reisin, 2004). Ciò che però è noto è il loro ruolo nella trasmissione a lunga distanza di onde di calcio tra astrociti (Oberheim et al., 2009).

Gli astrociti protoplasmatici umani sono localizzati negli strati corticali II-VI e risultano essere i più numerosi nella materia grigia di primati non umani, roditori, e umani.

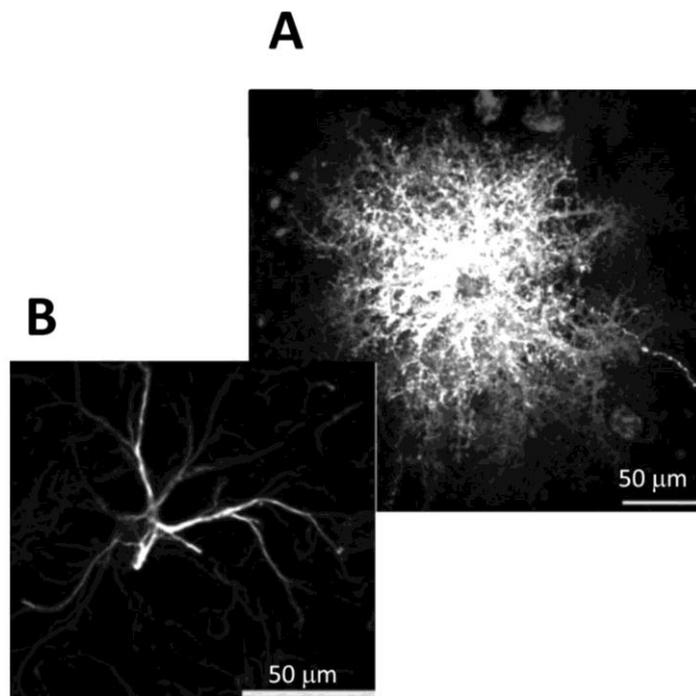


Figura 4 A) Immagine di marcatura immunofluorescente di un astrocita umano in vivo marcato con GFAP. B) marcatura immunofluorescente di un astrocita di ratto in vivo marcato con GFAP. Tratto da Oberheim et al., *The Journal of Neuroscience*, 2009)

Gli astrociti protoplasmatici umani si differenziano dagli omologhi roditori sotto diversi punti di vista: i primi risultano avere un diametro 2,6 volte più

grande, traducendo questo fatto in un aumento di volume di quasi 16.5 volte rispetto a quello occupato dalle cellule provenienti da roditore, e presentando un numero di processi almeno dieci volte superiore in numero (3,75 in media per i roditori e 37,5 in media per gli umani). Inoltre, la lunghezza delle diramazioni degli astrociti umani presenta una media lunghezza pari 98 μm , a differenza di quella dei roditori che risultano essere estesi in media per 37 μm . Una delle poche analogie è rappresentata dall'organizzazione di queste cellule, in entrambe le specie, infatti, gli astrociti protoplasmatici si presentano in domini. Se si analizza la densità sinaptica, questa per i roditori risulta essere di circa 1100 milioni di sinapsi per mm^3 , quindi ogni dominio protoplasmatico può interagire con circa 100.000 sinapsi, nell'essere umano invece la densità è stimata per 1397 sinapsi per mm^3 , quindi **ogni dominio di astrociti protoplasmatici può interagire con più di un milione di sinapsi**. Questa differenza tra specie pone il quesito su come gli astrociti umani abbiano la capacità di modulare la trasmissione dei segnali neuronali e di integrare le informazioni provenienti da sinapsi multiple così da aumentare la potenza computazionale del cervello (Oberheim, Wang, Goldman, & Nedergaard, 2006).

Gli astrociti fibrosi sono situati nella materia bianca, e si presentano più estesi ma con meno ramificazioni rispetto ai protoplasmatici. Di tutte le sottocategorie di astrociti, i fibrosi sono quelli con minor numero di differenze tra la specie umana e quella dei roditori. Quelli appartenenti alla prima categoria di specie presentano un diametro di 183 μm , mentre nei ratti e topi questo risulta essere di soli 86 μm (Oberheim et al., 2009). Gli astrociti fibrosi non si sviluppano in domini, ma sono distribuiti nella materia bianca formando una struttura simil-reticolare che può fornire supporto metabolico e strutturale ai tratti assonici dei neuroni.

1.3 FUNZIONI FISILOGICHE DEGLI ASTROCITI

1.3.1 Gli astrociti e l'omeostasi cerebrale

1.3.1.1 L'omeostasi

Nell'essere umano l'acqua è il costituente principale dell'organismo, rappresenta, in un individuo adulto, il 60% del peso corporeo. A livello

cellulare, questa è situata in due compartimenti differenti: il liquido extracellulare (LEC) e il liquido intracellulare (LIC), divisi dalla membrana plasmatica formata da un doppio strato fosfolipidico. Le differenze tra i due compartimenti risiedono non solo nella loro composizione chimica ma anche nella concentrazione degli ioni che ve ne appartengono, infatti gli ioni potassio (K^+), cloro (Cl^-), sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}) e carbonato (HCO_3^-) si presentano in entrambi i distretti ma in concentrazioni diverse. Nel liquido extracellulare abbiamo una maggior presenza di Na^+ (145 mM), HCO_3^- (30 mM) e Cl^- (120 mM), mentre in quello intracellulare sono più concentrati lo ione K^+ (150 mM) e lo ione Mg^{2+} (30 mM). Nonostante la divisione tramite la membrana cellulare, questi due fluidi possono scambiarsi reciprocamente quantità ioniche grazie ai canali trasportatori e proteine di membrana che incidono sulla permeabilità di essa.

Proprio grazie a questi processi di scambio si può definire il LEC come “mezzo interno”, in quanto funge da interfaccia tra l’ambiente esterno ad un organismo e il LIC. Inoltre, questo interscambio molecolare tra i due compartimenti permette di mantenere la differenza di composizione tra i due liquidi fornendo così stabilità all’organismo.

Il mantenimento dell’ambiente interno relativamente costante viene definito come omeostasi, e questa rappresenta la condizione fondamentale per lo svolgimento delle corrette attività fisiologiche dell’organismo. L’omeostasi viene modulata da un insieme di meccanismi che si distinguono in: meccanismi a retroazione (feedback) negativa, se in seguito ad un’alterazione il sistema risponde in direzione opposta al cambiamento che l’ha prodotta, e meccanismi a feedback positivo, se, invece, in seguito ad un’alterazione il sistema risponde nella stessa direzione che ha generato tale cambiamento. In quest’ultimo caso si necessita dell’intervento di un secondo stimolo esterno che ne induca la fine. Affinché avvenga la modulazione, l’omeostasi necessita anche di sistemi di controllo che la analizzino momento per momento, questi si suddividono in: meccanismi di controllo locali, attivati da una variazione isolata che causa una risposta paracrina e autocrina, e meccanismi di controllo a lunga distanza o controllo riflesso, attivati da una variazione di natura sistemica.

1.3.1.2 Omeostasi e regolazione della concentrazione degli ioni negli astrociti

Gli astrociti sono i responsabili del mantenimento dell'omeostasi dell'ambiente cerebrale, in quanto dotati di numerosi canali ionici presenti nei loro processi.

L'omeostasi ionica del sistema nervoso risulta essere uno dei parametri vitali più importanti del nostro organismo, poiché, su tutti, regola l'eccitabilità neuronale e quindi la trasmissione sinaptica. Le concentrazioni ioniche nel tessuto nervoso, come per il resto dell'organismo, non sono statiche e il loro flusso regola processi nervosi tra cui la memoria e il sonno.

Perciò è necessario conoscere approfonditamente le funzioni e i compiti a cui adempiono gli astrociti per riuscire a comprendere in toto la fisiologia del sistema nervoso e prevederne gli effetti in condizioni patologiche.

La prima scoperta nel mantenimento dell'omeostasi ionica da parte gli astrociti venne proposta nella metà degli anni Sessanta da Leif Hertz, Steven Kuffler e Richard Orkand, i quali trovarono che gli astrociti controllavano la concentrazione interstiziale di K^+ ($[K^+]_o$).

La concentrazione extracellulare dello ione potassio è un parametro che è in continuo cambiamento, in quanto subisce degli aumenti (di $\sim 1\text{mM}$ per singolo potenziale d'azione (Ransom, Ransom, & Sontheimer, 2000)) associati alla ripolarizzazione dei neuroni, che causa un flusso in uscita di ioni K^+ dai neuroni (Hirase et al., 2004). Inoltre, è da registrare che un aumento della $[K^+]_o$ è dovuto anche all'attivazione dei recettori ionotropici postsinaptici del glutammato (Rice & Nicholson, 1990), in particolare attraverso gli NMDA, oppure tramite la pompa K^+-Cl^- attivata durante la trasmissione GABAergica (Viitanen, Ruusuvoori, Kaila, & Voipio, 2010). Il flusso ionico del potassio in ambiente cerebrale può avvenire anche grazie all'attivazione del trasportatore EAAT1/2 del glutammato degli astrociti (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017).

La regolazione di $[K^+]_o$ da parte degli astrociti è gestita da diversi meccanismi che talvolta si sovrappongono, quali: la diffusione attraverso i canali ionici del potassio, trasporto attivo tramite la neurochinina-A (NKA), e trasporto grazie ai trasportatori di soluti SLC. Tutti e tre i meccanismi sono stati studiati sia in situ che in vitro, e i risultati degli esperimenti hanno evidenziato come

collaborino effettivamente nel mantenimento dell'omeostasi del potassio (Kofuji & Newman, 2004).

La regolazione omeostatica del potassio avviene inizialmente con l'entrata del K^+ nell'astrocita tramite i canali del potassio presenti sulla membrana cellulare, successivamente questi ioni vengono ridistribuiti nel sincizio gliale tramite le giunzioni comunicanti, (gap junctions) situati nel punto di connessione tra due membrane di astrociti adiacenti, per essere, infine, rilasciati dai pedicelli o dai processi perivascolari.

Studi in vitro ed in vivo hanno dimostrato che il canale del potassio maggiormente transitato coinvolto nell'omeostasi del K^+ in astrociti risulta essere il canale del potassio a rettificazione entrante detto $K_{ir}4.1$, (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017). La struttura di questo canale è a 2 α -eliche transmembrana (2 STM), e la mancanza di nessun sensore di voltaggio dimostra come la sua attivazione non dipenda dal potenziale di membrana bensì da meccanismi specifici per questo canale (rettificazione intrinseca). Una forte concentrazione di $K_{ir}4.1$ è stata trovata nelle glia perisinaptiche, dimostrando la sua capacità di catturare ioni potassio da spazi molto stretti come nel caso della fessura sinaptica (Nwaobi, Cuddapah, Patterson, Randolph, & Olsen, 2016).

Nel mantenimento dell'omeostasi del potassio, questo canale ha la funzione sia di ricaptare gli ioni potassio dallo spazio extracellulare dove questo è più concentrato rispetto ai valori di controllo, a seguito dell'attività neuronale, che di rilasciarlo dall'interno dell'astrocita o di estrarlo dove la concentrazione di potassio è minore, ovvero a livello dei pedicelli che si affacciano sui capillari sanguigni. Dunque, la regolazione omeostatica dello ione potassio dipende strettamente dall'abilità dei canali $K_{ir}4.1$ di accumulare localmente K^+ e dalla capacità di redistribuzione delle gap-junctions.

Esperimenti in vitro hanno dimostrato che i canali $K_{ir}4.1$ sono i principali responsabili della permeabilità allo ione potassio per gli astrociti (Neusch, Rozengurt, Jacobs, Lester, & Kofuji, 2001). L'espressione di questi canali, però, differisce da regione a regione nel cervello, cambiando, quindi, anche il relativo apporto di questi canali nell'omeostasi del potassio.

Il rilascio dello ione K^+ può anche avvenire tramite altri canali, ovvero tramite i trasportatori di soluti SLC, tra cui si annovera il NKCC1. Questo canale

partecipa all'omeostasi del potassio in culture di astrociti, anche se ciò non è stato dimostrato tramite studi in situ e in vivo (Larsen et al., 2014). Il NKCC1 è attivato per valori di ione potassio al di sopra di 10mM (Walz & Hertz, 1984) oppure dalla ipertonicità extracellulare, dimostrando come possa contribuire nella clearance del K^+ in contesti patologici (Qusos, Geewan, Grenwell, & Kerrigan, 2011).

stabilizzazione Fondamentale per l'omeostasi di K^+ anche il ruolo della pompa Na^+/K^+ ATPase (NKA). Il dato che l'omeostasi di K^+ fosse dipendente da energia (ATP) attraverso la NKA è stato scoperto inizialmente in esperimenti compiuti su colture primarie di astrociti (Hertz L., 1979). Diversi esperimenti vennero svolti successivamente in situ per poter analizzare il ruolo della NKA nella clearance extracellulare dello ione potassio, ricavando come la NKA assumesse un ruolo di primo piano (Larsen et al., 2014). In questo scenario, gli ioni K^+ accumulati negli astrociti risultano essere rilasciati successivamente nello spazio extracellulare per essere ricaptati dai neuroni, ristabilendo così il gradiente ionico. Gli astrociti, così, stabilizzano l'eccesso di K^+ rilasciato durante l'attività neuronale, e, quando i neuroni smettono di condurre segnali, gli ioni potassio vengono trasportati ai rispettivi compartimenti neuronali (Hertz & Chen, 2016).

Il processo di omeostasi ionica degli astrociti non si limita soltanto alla stabilizzazione dello ione potassio, bensì anche a quella degli ioni cloro e del calcio. Forti stimolazioni dei recettori neuronali GABAergici possono portare ad una eccessiva diminuzione della concentrazione di ioni Cl^- a livello dello spazio intersinaptico. Gli astrociti in risposta all'attività dei recettori GABAergici promuovono l'efflusso dello ione cloro dal loro citoplasma. Di conseguenza, il rilascio astrogliale di cloro, può contrastare l'ingresso dello ione cloro nei neuroni, mantenendo così una corretta concentrazione extracellulare di cloro ($[Cl^-]_o$) necessaria per un'entrata di cloro nei neuroni in caso di un'eventuale sinapsi inibitoria (Kettenmann, Backus, & Schachner, 1987). Questa ipotesi è stata confermata da esperimenti recenti, che hanno dimostrato il ruolo degli astrociti nel mantenimento della neurotrasmissione GABAergica (Egawa, Yamada, Furukawa, Yanagawa, & Fukuda, 2013).

Gli astrociti, inoltre, contribuiscono alla regolazione della concentrazione extracellulare dello ione calcio ($[Ca^{2+}]_o$). Infatti, durante l'attività neuronale,

$[Ca^{2+}]_o$ nella fessura perisinaptica scende sotto valori fisiologici grazie ad un massiccio influsso di Ca^{2+} nei neuroni a causa dell'attivazione dei canali di questo ione sulla membrana neuronale. La $[Ca^{2+}]_o$ può decrescere fino ad un valore al di sotto di 1mM, inducendo il rilascio di ATP da parte degli astrociti che sollecitano l'attivazione dei neuroni ippocampali (Torres, Wang, Xu, Fujita, & Dobrowolski, 2012). Se il valore della $[Ca^{2+}]_o$ scende a valori al di sotto dei 0,5mM si innesca un meccanismo di rilascio di Ca^{2+} da parte dei canali $InsP_3$ sulla membrana endoplasmatica del reticolo endoplasmatico (ER) negli astrociti (mediato probabilmente da un rilascio autocrino di ATP) (Zanotti & Charles, 1997), in seguito gli astrociti rilasceranno, tramite i canali di calcio presenti sulla membrana cellulare e la pompa Na^+/Ca^{2+} , una quantità di ioni calcio tali da riequilibrare la $[Ca^{2+}]_o$.

1.3.1.3 Regolazione del volume cellulare

Il processo di omeostasi per lo ione potassio attuato dagli astrociti avviene grazie all'ingresso dall'ambiente extracellulare negli astrociti tramite i canali Kir4.1. Questo meccanismo induce una redistribuzione dell'acqua, generando un rigonfiamento locale dell'astrocita nel sito in cui vi è l'accoppiamento glianeurone, e un restringimento nei siti distanti da questo accoppiamento (Holthoff & Witte, 2000). In aggiunta il rilascio sinaptico di glutammato attiva i trasportatori di questa molecola presenti sull'astrocita perisinaptico (Bergles & Jahr, 1997), i quali possono condizionare l'influsso di acqua e Na^+ , causando un aumento del gonfiore della cellula (Macaulay, Gether, Klærke, & Zeuthen, 2001).

Un rigonfiamento astrocitario può causare un aumento dell'eccitabilità neuronale attraverso la riduzione dello spazio extracellulare, aumentando così la concentrazione di neurotrasmettitori. Per fare ciò, come nella maggior parte delle cellule dell'organismo, si attiva un processo omeostatico chiamato "regolazione della diminuzione del volume cellulare" (RVD), grazie al quale gli astrociti tendono a ripristinare il loro volume originale per prevenire danni cellulari. Il processo RVD è stato studiato principalmente in culture di astrociti, tramite l'esposizione di queste cellule ad un mezzo iposmolare e alte concentrazioni di K^+ , le quali inducevano gonfiore alle cellule attivando così il meccanismo RVD. Questa regolazione implica il trasporto attivo o l'apertura di canali sensibili alle variazioni di volume per riuscire a mediare l'efflusso di

ioni e osmoliti organici presenti nell'acqua. Uno dei canali maggiormente coinvolti nel processo RVD risulta essere il canale anionico volume-regolatore (VRAC). Nonostante l'identità molecolare di questa tipologia di canali non risulti essere totalmente nota, le sottounità che formano il poro sono state identificate come appartenenti alla famiglia delle proteine LRRC8A-E (Qiu et al., 2014; Voss, 2014). I VRAC si aprono in seguito ad un rigonfiamento della cellula e portano ad un efflusso di anioni, Cl^- , e osmoliti organici, ad esempio la taurina. Per mantenere la neutralità elettrica, l'efflusso di anioni deve essere bilanciato con uno di cationi, così facendo gli astrociti rilasciano gli ioni K^+ . La fuoriuscita di ioni spinge anche quella dell'acqua, forzando, così, la riduzione del volume cellulare. L'efflusso di acqua è regolato anche dai canali acquaporina-4 (AQP4) nel cervello (Nagelhus & Ottersen, 2013).

I canali VRAC non sono gli unici canali a contribuire nella RVD degli astrociti, infatti anche i canali del cloro ClC-2 assumono un ruolo rilevante, essendo sensibili anche loro alle variazioni del volume cellulare. Inoltre a questo importante meccanismo aderiscono anche i canali che determinano variazioni transitorie di potenziale della sottofamiglia V4 (TRPV4) (V Benfenati & Amiry-moghaddam, 2007). L'apertura di questi canali durante il rigonfiamento degli astrociti è necessaria poiché induce un influsso di ioni Ca^{2+} che attiva una cascata di segnali che inducono l'attivazione del processo RVD (Benfenati et al., 2011).

1.4 LA MODULAZIONE SINAPTICA ASTROGLIALE E LA SINAPSI TRIPARTITICA

Le ricerche compiute nelle ultime due decadi, hanno rivelato che, oltre alla funzione propriamente omeostatica, gli astrociti sono criticamente coinvolti nella regolazione delle funzioni sinaptiche. Infatti, è stato dimostrato come gli

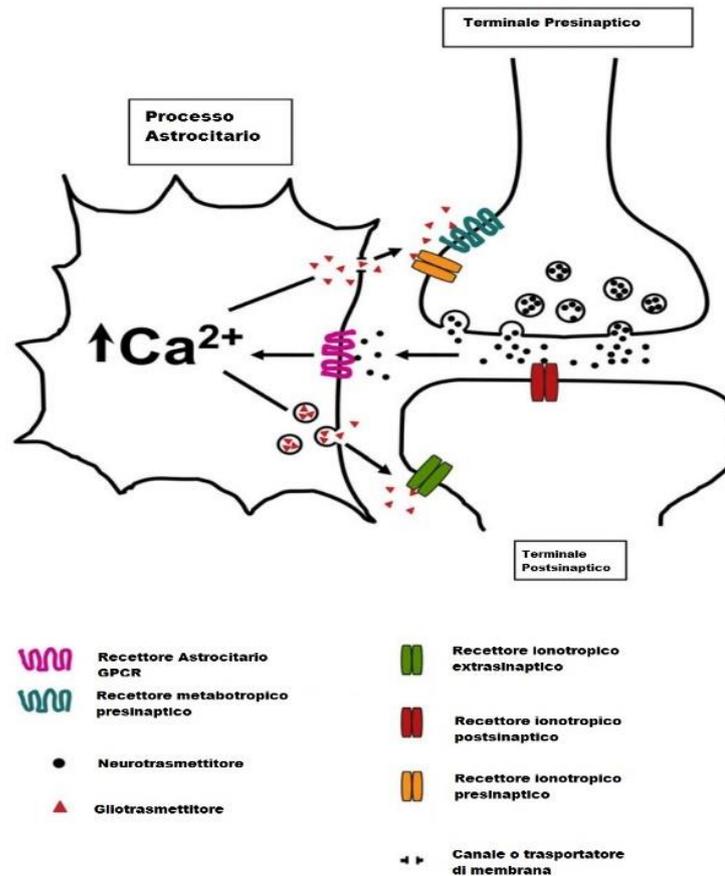


Figura 5 Schema della sinapsi tripartitica tratto da Agulhon et al. Cell Press, 2008

astrociti rispondano ai neurotrasmettitori rilasciati, nella fessura sinaptica, dal neurone presinaptico tramite il rilascio a loro volta di gliotrasmettitori, i quali regolano l'attività neuronale riuscendo così a modulare la trasmissione dei segnali elettrici cerebrali (Perea, Navarrete, & Araque, 2009). Inoltre gli astrociti rilasciano molecole bioattive, dette gliotrasmettitori. Il rilascio di gliotrasmettitori, tra i quali si annoverano glutammato, ATP e acido γ -amminobutirrico (GABA), è mediato dall'attività dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR), i quali si attivano in risposta al rilascio neuronale di neurotrasmettitori, inducono la generazione di segnali di calcio astrogliali che

permettono il successivo rilascio di gliotrasmettitori (Agulhon et al., 2008). Basandosi su questo scambio di segnali bidirezionali tra neuroni e astrociti, è stata concepita l'idea della *sinapsi tripartitica*, la quale risulta essere un concetto completamente nuovo e rivoluzionario per gli studi fisiologici. Questa idea propone, infatti, gli astrociti come parti integrate e funzionali della sinapsi, dimostrando di avere un ruolo chiave come le altre due componenti che la formano, ovvero il neurone presinaptico e quello postsinaptico.

La progressiva affermazione del concetto della sinapsi tripartitica ha stimolato grande interesse se ne è parlato nel possibile rilascio di neurotrasmettitori da parte degli astrociti. Numerosi studi sia *in vitro* (in co-culture di astrociti e neuroni) che *in situ* hanno dimostrato questo meccanismo di rilascio (Maiken Nedergaard & Verkhratsky, 2012; Sahlender, Savtchouk, & Volterra, 2014). Gli astrociti contengono delle riserve di neurotrasmettitori, tra cui GABA, ATP e glutammato, e dispongono di un numero importante di diversi meccanismi di rilascio, i quali però risultano essere più lenti rispetto ai corrispondenti meccanismi presenti nei terminali neuronali (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017). Nonostante ciò, il rilascio astrogliale sembra essere più diffuso nello spazio extracellulare, in quanto gli astrociti risultano essere mancanti di qualsiasi tipo di zona attiva presinaptica.

La modalità secondo cui il rilascio di gliotrasmettitori influenza la trasmissione sinaptica è molto ampia, e varia a seconda della regione cerebrale nella quale le componenti della sinapsi tripartitica sono situate, dimostrando la complessità delle comunicazioni tra astrociti e neuroni. Nel caso del glutammato, ad esempio, è stato dimostrato come questo possa inibire o evocare spontanee correnti postsinaptiche inibitorie (IPSCs) o eccitatorie (EPSCs) nella regione dell'ippocampo (Liu, Xu, Arcuino, Kang, & Nedergaard, 2004) o possa aumentare l'eccitabilità neuronale (Bezzi, Vesce, Rossi, Rizzini, & Volterra, 1998), e possa modulare la forza di trasmissione di una sinapsi tramite la regolazione del potenziamento a lungo termine (Long Term Potentiation, LTP) e della depressione a lungo termine (Long Term Depression, LTD) (Min & Nevian, 2012). Mentre l'ATP rilasciata dagli astrociti è stata dimostrata causare sia una soppressione che un potenziamento delle EPSCs (Serrano, Haddjeri, Lacaille, Robitaille, & Centre-ville, 2006), una inibizione dei recettori NMDA attraverso una cascata di segnali che passano per i recettori

P2X e le multi-proteine PSD-95 (Lalo, Palygin, Verkhratsky, Grant, & Pankratov, 2016), un aumento dell'eccitabilità neuronale, e la modulazione della LTP (Lee et al., 2012).

Grazie a recenti studi, il modello della sinapsi tripartita è stato ulteriormente sviluppato dando vita al concetto di *sinapsi multipartita*, la quale è formata da cinque componenti: il terminale presinaptico, il dendrite postsinaptico, il processo perisinaptico di un astrocita, il processo di una microglia vicina che periodicamente entra in contatto con la struttura sinaptica, e la matrice extracellulare (ECM), che rappresenta la fessura sinaptica e si estende anche all'esterno (Maiken Nedergaard & Verkhratsky, 2012; Verkhratsky, Nedergaard, B, Verkhratsky, & Nedergaard, 2014). Questo ultimo concetto più di qualsiasi altro sottolinea il ruolo fondamentale degli astrociti nella connettività sinaptica, i quali svolgono le funzioni di controllo durante la nascita e modellamento della rete sinaptica, di regolazione dell'omeostasi ionica della fessura sinaptica, di controllo della dinamica dei neurotrasmettitori tramite la regolazione del rilascio di questi ultimi sia da parte dei neuroni che da parte degli astrociti stessi, e di contributo all'estinzione sinaptica.

1.5 MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELLE FUNZIONI FISILOGICHE DEGLI ASTROCITI

1.5.1 I canali ionici espressi in astrociti.

1.5.1.1 Canali anionici (canali del cloro e misti)

Le correnti ioniche di Cl^- , dipendenti dalla tensione applicata all'intera cellula, vennero osservate in colture di astrociti depolarizzati ad un potenziale poco sopra i -50 mV (Gray & Ritchie, 1986). Questa scoperta però non venne replicata in altri studi, dimostrando la quasi completa assenza di conduttanza anionica per gli astrociti al potenziale di riposo (Harold K Kimelberg, Macvicar, & Sontheimer, 2006). Se però queste cellule vengono sottoposte a cambiamenti della loro morfologia, causati principalmente da una differenza di pressione osmotica o dalla diminuzione delle concentrazioni di adenosina monofosfato (cAMP), si può registrare un'attivazione della conduttanza per lo

ione cloro (Cl^-) (Lascola & Kraig, 1996), dovuta all'attivazione dei canali anionici presenti sulla membrana degli astrociti.

La concentrazione di cloro negli astrociti risulta essere un fattore molto importante in quanto influisce sull'omeostasi dello ione potassio (K^+) in queste cellule e nello spazio extracellulare (Coles, Orkand, & Yamate, 1989), modulando così anche l'attività elettrica neuronale (Hinkle, 1971).

I canali anionici possono essere classificati in cinque famiglie: i canali del cloro voltaggio-dipendenti CIC, i canali cistici fibrosi regolatori della conduttanza transmembrana CFTR, i canali anionici volume-regolatori VRAC i canali anionici voltaggio-dipendenti VDAC e i canali del Cl^- attivati dal Ca^{2+} (Harold K Kimelberg et al., 2006). Questa tipologia di canale di membrana ha la funzione di consentire il flusso di correnti ioniche cariche negativamente seguendo, come nel caso di tutti i canali, il gradiente elettrochimico.

I CIC raggruppano i canali CIC-0, CIC-1, CIC-K1, CIC-K2, CIC-2, CIC-3 e CIC-4. I CIC risultano essere canali *inwardly rectifying* ovvero stabiliscono la loro apertura in base al potenziale di membrana, se la membrana è in condizioni di iperpolarizzazione allora i canali saranno aperti, mentre invece si chiuderanno se la membrana è in condizione di depolarizzazione. Il canale di cloro voltaggio-dipendente più presente negli astrociti risulta essere il CIC-2, localizzandosi nei processi in prossimità di sinapsi GABAergiche; ciò ha indotto a ipotizzare un ruolo degli astrociti nella regolazione della concentrazione di Cl^- nella fessura sinaptica e quindi nella regolazione della trasmissione GABAergica (Smith, Freund, & Sik, 2000). L'apertura di questo canale avviene solo se il potenziale di membrana supera il potenziale di riposo per lo ione Cl^- ; l'apertura, inoltre, può essere indotta da variazioni di volume della cellula, suggerendo un ruolo di questo canale nella regolazione del volume cellulare (Smith et al., 2000).

I canali CFTR sono indipendenti dal voltaggio della membrana dell'astrociti in cui risiedono, bensì la loro attivazione deriva dalla fosforilazione cAMP-dipendente e dalla presenza di nucleotidi (H K Kimelberg, Pang, & Higman, 1990).

I canali VRAC gestiscono il controllo del volume cellulare e contribuiscono alla regolazione della proliferazione cellulare e la mobilità cellulare (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017). Negli astrociti, i VRAC gestiscono la diminuzione

volumica degli astrociti che si sono gonfiati a causa di uno squilibrio osmotico (Harold K Kimelberg et al., 2006). È stato dimostrato che questa tipologia di canali ricopre un ruolo anche nella transito degli amminoacidi eccitatori, infatti grazie ad uno studio di H K Kimelberg et al., 1990 si è potuto monitorare il rilascio di taurina, glutammato e aspartato. Questo fenomeno risulta essere decisamente importante in quanto stabilisce come gli astrociti siano in grado di interagire con i neuroni, confermando, soprattutto nel caso del rilascio di glutammato, l'ipotesi della sinapsi tripartita. Il rilascio del glutammato è stato osservato anche in culture primarie di astrociti (Feustel, Jin, & Kimelberg, 2004) e in astrociti in situ (Bradley et al., 2002).

1.5.1.2 Canali cationici (canali del calcio del sodio e connessine)

Gli astrociti riescono ad adempiere alle proprie funzioni, quali ad esempio il controllo dell'omeostasi cerebrale, non solamente grazie ai canali anionici, ma anche grazie a quelli cationici, risultando fondamentali per la regolazione dell'ambiente cerebrale, e per lo scambio di segnali di calcio che permettono la comunicazione tra astrociti, i quali possono a loro volta modularne l'attività in modo da gestire tra l'altro anche la trasmissione dei segnali neuronali partecipando attivamente alla sinapsi tripartita.

Tra i canali cationici si annoverano quelli del sodio che sono distinti principalmente in tre categorie: canali del sodio voltaggio-dipendenti (Na_v), canali del sodio Na^+ -regolati (Na_x) e canali del sodio epiteliali (ENaC).

La prima tipologia si sviluppa in 9 isoforme (da $\text{Na}_v1.1$ a $\text{Na}_v1.9$) (Brackenbury W. J., Isom L. L., 2011). Nonostante la notevole quantità di dati ricavati da esperimenti che identificano i canali Na_v provenienti da regioni del cervello differenti, l'esatta localizzazione e i meccanismi di attivazione da stimoli fisiologici di questi canali restano da chiarire perfettamente. Tuttavia, questi canali sono stati individuati anche nei processi degli astrociti perisinaptici e, in seguito a depolarizzazioni indotte dall'attivazione di recettori ionotropi o di trasportatori di glutammato Na -dipendenti, possono generare segnali di sodio locali, i quali possono controllare numerosi processi omeostatici (Kirischuk, Parpura, & Verkhratsky, 2012). Inoltre i canali Na_v partecipano a numerosi processi fisiologici tra cui la risposta patologica degli astrociti (Pappalardo, Black, & Waxman, 2016), e la regolazione del flusso di Na^+ per il

sostentamento della pompa Na^+/K^+ , la quale risulta essere fondamentale per la vitalità della cellula.

I canali Na_x sono dipendenti dalla concentrazione dello ione sodio nello spazio extracellulare, dagli studi di Hiyama et al., 2013) è emerso come *in vitro* questi si attivano con una concentrazione 150 mM, mentre *in vivo* necessitano di una concentrazione 140mM, questa diminuzione è dettata dalla presenza dell'endotelina-3, che attiva i recettori ETB espressi negli astrociti.

L'ultima categoria di canali del sodio è rappresentata dagli ENaC. Questi non risultano essere sensibili alla tensione e sono espressi nel SNC non solamente negli astrociti ma anche nei neuroni, nelle cellule ependimali del plesso coroideo, e nelle cellule endoteliali (R. L. Miller et al., 2013). Gli ENaC si presentano in modo particolare negli astrociti degli organi circum ventricolari, indicando un ruolo nella regolazione dell'omeostasi sistemica per lo ione sodio (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017).

Tra i canali cationici spiccano per rilevanza, in quanto veri e propri regolatori della comunicazione tra astrociti e tra astrociti e neuroni, i canali del calcio.

Questi si classificano in: canali del calcio voltaggio dipendenti (VGCC), canali di calcio intracellulari e canali che determinano variazioni transitorie di potenziale (TRP) (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017).

La prima tipologia è a sua volta suddivisa in tre famiglie: i $\text{Ca}_v1.1-1.4$ detti anche L-type, i $\text{Ca}_v2.1-2.3$ detti anche P/Q/R-type e i $\text{Ca}_v3.1-3.3$ detti anche T-type. Evidenze per l'espressione funzionale di questi canali negli astrociti, tuttavia, rimangono controverse. Grazie ad esperimenti di elettrofisiologia sono state registrate correnti di calcio indotte da una differenza di potenziale, che hanno permesso l'identificazione dei canali L-type (R. H. Miller & Raff, 1984).

Successivamente, analizzando a livello molecolare il trascrittoma degli astrociti corticali dei roditori, sono stati evidenziati geni che permettono lo sviluppo di canali L-type, P-type, R-type e T-type (Words, 2003).

Un aumento di espressione dei canali L-type è stato registrato in condizioni patologiche quali lesioni meccaniche o ischemiche negli astrociti lesionati. Nonostante questa scoperta, non si è ancora riuscito ad identificare il ruolo di questo canale di calcio in queste condizioni.

I canali intracellulari del calcio sono rappresentati da tre famiglie: recettori dell'inositolo trifosfato o InsP_3Rs , recettori della rianodina o RyRs , e il canale a due pori (TPC) attivato dall'acido nicotinico adenindinucleotide fosfato (NAADP). Le prime due tipologie risiedono nella endomembrana del reticolo endoplasmatico (ER) (Verkhatsky, 2005), mentre l'altra tipologia risiede nelle riserve acide di Ca^{2+} (Calcraft et al., 2009). I recettori InsP_3 si classificano in tre gruppi: $\text{InsP}_3\text{R1}$, $\text{InsP}_3\text{R2}$, e $\text{InsP}_3\text{R3}$, tutti e tre sono attivati da InsP_3 e modulati dallo ione calcio. I $\text{InsP}_3\text{R1}$ presentano una regolazione alla concentrazione intracellulare di calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) particolare, in quanto la loro probabilità di apertura aumenta tra i valori di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in condizioni normali, ovvero tra 50 e 100nM, e $\sim 1\mu\text{M}$, mentre per valori più alti di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ il canale risulta essere inibito. Il canale $\text{InsP}_3\text{R2}$ sembra essere quello più presente tra i canali di questa categoria negli astrociti (Verkhatsky, Rodríguez, & Parpura, 2012). La delezione genetica del tratto che regola la presenza di questo canale dimostra come il rilascio di calcio dall'ER sia fortemente ridotto in astrociti corticali e dell'ippocampo (Kanemaru et al., 2013), dimostrando comunque un rilascio, anche se notevolmente più attenuato da parte di questo organello presente negli astrociti dovuto alla presenza del $\text{InsP}_3\text{R1}$.

Anche i canali RyR si suddividono in 3 sottocategorie (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017): i RyR1 (anche conosciuto come "scheletrico"), RyR2 (anche conosciuto come "cardiaco") e RyR3 (anche conosciuto come "cerebrale"). Questa tipologia di canali è attivata dalla presenza dello ione calcio nel citosol e svolge un ruolo di amplificazione dei segnali di calcio; questi inoltre possono essere stimolati dalla presenza del secondo messaggero dell'ADP-ribosio ciclico (cADPR). Il ruolo funzionale dei canali della rianodina purtroppo non è stato ancora ben identificato. Tuttavia, in culture di astrociti sono stati osservati segnali di calcio (presumibilmente riconducibili al rilascio di Ca^{2+} mediato dai canali RyR) indotti dalla caffeina (Simpson P. B., Holtzclaw L. A., Langley D. B., Russell J. T., 1998) e in astrociti del talamo.

Riguardo all'espressione dei canali TPC in astrogliia non molto risulta essere noto. Pereira nel 2011, ha dimostrato che la presenza di 100 nM di NAADP inneschi un rilascio di ioni calcio dagli organelli acidi in colture di astrociti di ratto. Inoltre, tramite gli studi di è stato suggerito che i canali TPC

contribuiscono nella trasmissione di segnali calcio indotta da ATP e endotelina-1 negli astrociti.

La famiglia dei canali TRP risulta essere una delle più estese nel corpo umano presentandosi con 27 isoforme (Nilius & Owsianik, 2011), questi canali contribuiscono con la loro attività in diverse funzioni fisiologiche assumendo un ruolo di sensore in diversi parametri corporei come la temperatura, la nocicezione, l'equilibrio e il gusto (Nilius & Appendino, 2013). I canali TRP sono canali cationici permeabili non solamente allo ione calcio, ma anche agli ioni sodio e potassio (Nilius, 2012). Nel SNC tutte le tipologie di TRP sono espresse a diversi livelli (Nilius, 2012), cosa che non avviene negli astrociti, dove solo alcune categorie riescono a trovare la loro localizzazione (Takata et al., 2011); tra questi si annoverano i TRPA, i TRPC, e i TRPV.

La prima tipologia è attivata da diversi fattori tra cui un abbassamento eccessivo di temperatura, da agenti infiammatori (Nilius, Appendino, & Owsianik, 2012) e da fattori di crescita (via GPCR). I canali TRPA sono stati identificati nei processi somatici di astrociti del tronco encefalico, nel nucleo caudale del nervo trigemino di ratti (Hsu, Seldin, Lee, & Seifert, 2011) geni per l'espressione di questi canali sono stati identificati in una subpopolazione di astrociti dell'ippocampo in coculture con neuroni (Shigetomi, Tong, Kwan, Corey, & Khakh, 2012). La $[Ca^{2+}]_i$ citosolica controllata e gestita dai TRPA suggerisce un ruolo nella regolazione e nell'assorbimento di GABA e di D-serina da parte degli astrociti.

I canali TRPC sono stati localizzati in culture primarie di astrociti. Questa tipologia di canali è implicata nella generazione di oscillazioni di $[Ca^{2+}]_i$ indotti da diacilglicerolo, un analogo dell'oleil-acetil-glicerolo, nella stimolazione dei recettori metabotropici del glutammato o nello svuotamento delle riserve dell'ER da Ca^{2+} (Pizzo, Burgo, Pozzan, & Fasolato, 2001). L'attivazione dei TRPC contribuisce all'innescare di segnali di calcio evocati da stimolazioni meccaniche, purinergiche e glutamminergiche (Malarkey, Ni, & Parpura, 2008). La tipologia TRPV include sei membri, che sono attivati da stimoli termici, chimici e nocivi (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017), risultando, inoltre, essere sensibili alla pressione osmotica. Grazie alle tecniche di indagine della microscopia immunoelettronica e dell'evidenziazione immunocitochimica si è riusciti a localizzare i canali TRPV in diverse regioni

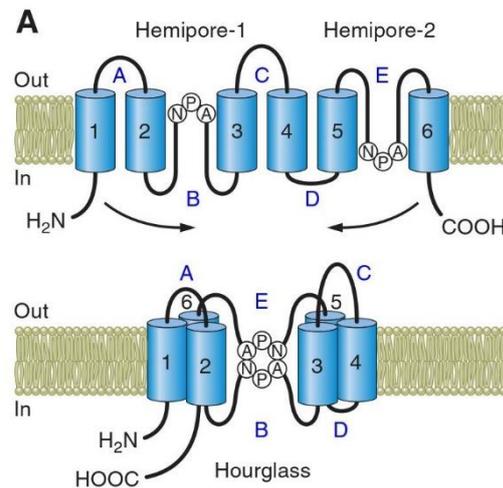
del cervello, del midollo spinale, e soprattutto nella parte finale dei processi degli astrociti, dei roditori (Doly, Fischer, Salio, & Conrath, 2004). Nelle colture di astrociti i canali TRPV1 sostengono le correnti cationiche generate dall'acidificazione extracellulare (Oberheim Bush & Nedergaard, 2017). Questi canali possono, inoltre, contribuire alla regolazione o iniziazione dell'astrogliosi del midollo spinale (Chen, Willcockson, & Valtschanoff, 2009), e al riallestimento Ca^{2+} -dipendente del citoscheletro (Ho, Lambert, & Calkins, 2014). Un altro membro della famiglia dei canali TRP, il TRPV4, è stato individuato nei processi degli astrociti corticali e dell'ippocampo (Baker et al., 2003). L'attività di questo canale è indotta dallo stress iposmotico e dal gonfiore cellulare. Attivandosi, i canali TRPV4 innescano segnali di calcio citosolici sensibili all'inibitore al rutenio rosso del TRPV, mentre l'agonista specifico 4 α -forbol 12,13-didecanoato induce correnti cationiche (V Benfenati & Amiry-moghaddam, 2007). Inoltre è stato ipotizzato come l'azione del TRPV4, insieme al canale dell'acquaporina AQP4, contribuisca allo sviluppo del processo di diminuzione del volume cellulare (Benfenati et al., 2011). Un'interazione tra TRPV4 e AQP4 sembra necessaria per la regolazione del volume cellulare, anche se questa non risulta essere ben chiara (Benfenati et al., 2011). Infatti, grazie ad esperimenti di coimmunoprecipitazione (Co-IP) e tramite un'analisi immunoistochimica è stato possibile dimostrare l'interazione di questi due canali di membrana, stabilendo la loro colocalizzazione sui pedicelli terminali. In seguito, è stato possibile ipotizzare che l'interazione tra AQP4 e TRPV4 si sviluppi in modo che il canale dell'acquaporina permetta l'influsso di acqua, causando un rigonfiamento della cellula in modo da attivare il canale TRPV4 che induce il successivo sviluppo del meccanismo RVD (Benfenati et al., 2011).

1.5.2 Acquaporine

Le acquaporine (AQPs) sono una famiglia di proteine di trasporto di piccole dimensioni situate sulla membrana cellulare. Nell'essere umano e nei roditori

esistono 14 differenti tipi di AQPs che possono essere divise in due macrofamiglie sulla base delle loro caratteristiche di permeabilità, che spesso coincide con specifici modelli di sequenza di amminoacidi che le compongono: la prima, comprendente AQP0, AQP1, AQP4, AQP5, AQP6, e AQP8 risulta essere permeabile solo all'acqua, mentre la seconda comprende AQP3, AQP7, AQP9 e AQP10, le quali risultano essere permeabili non solamente all'acqua ma anche a: alcuni gas (ad esempio CO₂, NO, NH₃ e O₂), ioni (ad esempio K⁺ e Cl⁻) piccoli soluti quali, in particolare, il glicerolo (King, Kozono, & Agre, 2004), e per questo vengono definite anche acquagliceroporine.

Le acquaporine sono complessi di quattro monomeri, ognuno di 28 kDa, che formano nel complesso tetrameri. Ogni monomero è composto da sei eliche (1, 2, 3, 4, 5, 6), o domini, transmembrana e da cinque anse di collegamento (A, B, C, D, E). L'architettura di base di queste unità funzionali è quindi formata da due tratti ripetuti (1-3 e 4-6), ciascuno costituito da tre domini transmembrana uniti tra di loro, congiunti con la sequenza di amminoacidi Asn-Pro-Ala (NPA) che si sovrappongono, grazie al ripiegamento delle anse B ed E, a



metà strada creando un poro per il transito dell'acqua (Nagelhus & Ottersen, 2013).

Figura 6 Struttura delle acquaporine. Tratto da Erlend A. Nagelhus, *Physiological Reviews* 2013

Secondo il modello, tre eliche da una parte e le altre tre dall'altra formano le pareti del canale, mentre la successione di amminoacidi Asparagina-Prolina-Alanina NPA, all'interno del canale, rappresenta il filtro di selettività (Murata et al., 2000). La struttura tridimensionale ha dimostrato che il canale nella zona iniziale ha una larghezza di circa a 14-15 Å. Nella parte centrale, per una lunghezza di circa 20 Å il canale mantiene una larghezza piuttosto stretta (intorno ai 4 Å) con un punto di restringimento minimo di circa 2.8 Å ritornando successivamente ad allargarsi. Le acquaporine sono presenti nel SNC, in particolare si trovano tre tipologie di questi canali di membrana:

AQP1 AQP4 e AQP9. Alcuni processi degli astrociti si distendono andando a circondare i vasi sanguigni nel SNC, in quelle che sono chiamati “pedicelli astrocitari” “*feetprocesses*” (King et al., 2004), contribuendo a formare la barriera emato-encefalica (BEE). La ristretta permeabilità all’acqua di questa membrana è dovuta alla presenza dell’AQP4. Questo canale si presenta in una forma polarizzata tramite la sua interazione intracellulare con α -sintrofina (Neely et al., 2001) oppure tramite l’interazione extracellulare con l’agrina (Mack et al., 2007). Nel cervello, l’AQP4 è stata localizzata prevalentemente negli astrociti subpiali che formano: la *membrana gliale-limitativa* (Papadopoulos & Verkman, 2013), che agisce come l’interfaccia SNC-liquido cerebrospinale (LCS), i pedicelli astrocitari perivascolari, la membrana basolaterale di cellule endoteliali e i processi subependimali astrocitari. Perciò si può notare come l’AQP4 si presenti ai confini tra cervello e i maggiori compartimenti contenenti acqua, suggerendo così la sua funzione di regolatrice di flusso di questa sostanza (Nielsen, Rash, Yasumura, Hudson, & Agre, 1998) (Nielsen et al., 1997). Inoltre l’AQP4 si presenta in organi circumventricolari, raggruppamenti cellulari collocati in regioni ventricolari paramediane privi di BEE, e nell’ippocampo (Hsu et al., 2011), a livello della membrana cellulare degli astrociti che li compongono.

Tramite studi svolti su topi, ai quali è stata diminuita l’espressione dell’AQP4 tramite delezione, si è potuto notare come queste cavie presentassero solo un lieve aumento del contenuto totale di acqua nel cervello, inducendo quindi a pensare che questo canale di membrana non abbia un ruolo nel trasferimento di acqua da e verso il cervello in condizioni fisiologiche normali, poiché questo può avvenire mediante percorsi indipendenti dall’AQP4. In condizioni patologiche, come ad esempio lesioni cerebrali, meningite e tumori cerebrali, le variazioni di flusso d’acqua aumentano causando una crescita della pressione intracranica. Quest’ultima può causare ischemia cerebrale e talvolta anche morte cerebrale. In queste situazioni l’AQP4 assume un ruolo cruciale, facilitando il trasporto d’acqua da e verso il cervello. Molti studi hanno descritto le funzioni di questo canale di membrana nel caso di edema cerebrale, analizzando le variazioni dei risultati da esperimenti su cavie che presentavano l’AQP4 e su altre che invece ne avevano una percentuale ridotta. Nonostante ciò non è chiaro se il ruolo dell’AQP4 esaspera l’edema cerebrale o se facilita la

clearance del fluido (Zador, Stiver, Wang, & Manley, n.d.)(Papadopoulos, 2005).

L'AQP1 risiede, invece, nella membrana cellulare delle cellule epiteliali del plesso corioideo, suggerendo così un ruolo nella secrezione del LCS. Questo canale è presente anche nelle cellule endoteliali vascolari negli organi circumventricolari (Nielsen, Smith, Christensen, & Agrett, 1993).

L'AQP9 a differenza delle altre due, è debolmente espressa nel cervello, e la sua localizzazione non risulta essere ben definita in quanto gli anticorpi disponibili contro questo canale mostrano una scarsa specificità. Nonostante queste problematiche, si sono riuscite ad individuare le AQP9 a livello della sostanza grigia, in particolare nei taniciti, cellule ependimali specializzate, che risiedono nelle regioni paramediane in cui la BEE è interrotta.

1.5.3 Segnali di calcio astrogliali: oscillazioni ed onde di calcio

1.5.3.1 Come si originano i segnali di Ca^{2+} astrogliali

Con il termine “onde di calcio” si intendono aumenti della concentrazione citoplasmatica di ioni Ca^{2+} , dovuta all'entrata di questi ioni dall'ambiente extracellulare, che si propagano radialmente, apparendo come onde, alle cellule adiacenti grazie all'attività di una cellula innesco.

Esistono due tipologie di onde di calcio, quelle che si propagano all'interno di una singola cellula definite come *Intracellular Calcium Waves (ICWs)* oppure quelle che si diramano tramite più cellule *Intercellular Calcium Waves (ICWs)*. La velocità e le dimensioni delle ICWs dipendono dalla natura e dalla forza dello stimolo d'innesco oltre dal meccanismo di propagazione. Le onde di calcio si propagano spesso per periodi di tempo che possono arrivare a decine di secondi con velocità comprese tra 10 e 20 m/s, coinvolgendo così decine o centinaia di cellule contigue (Charles, 1998).

Con la scoperta delle onde di calcio si è individuata una via extraneuronale per la rapida trasmissione dei segnali a lunga distanza all'interno del SNC (Cornell-bell, Finkbeiner, Cooper, & Smith, 1988). Ma la grandissima novità è risultata essere la scoperta che la generazione e propagazione di onde di calcio modula l'attività neuronale (Nedergaard, 1994; Parri, Gould, & Crunelli,

2001). La modalità con cui avviene questa regolazione è dipendente dal rilascio di “gliotrasmettitori”, tra i quali, i più importanti risultano essere l’adenosina trifosfato (ATP) e il glutammato (Bezzi et al., 2004).

Se in precedenza si pensava che la sinapsi fosse composta solo dal neurone presinaptico e da quello postsinaptico, in seguito a queste scoperte, si aggiunse un terzo componente: la *glia perisinaptica*. e dunque al concetto di *sinapsi tripartita* (Araque, Parpura, Sanzgiri, & Haydon, 1998; Covelo & Araque, 2015; Perea et al., 2009)

Per riuscire a capire come si generano le ICWs, è necessario prima definire e spiegare il ruolo degli organelli che prendono parte a questo fenomeno.

Sono 3 i compartimenti intracellulari fondamentali per la trasmissione e ricezione dei segnali di calcio: il citoplasma, il reticolo endoplasmatico (ER) e i mitocondri; il primo è delimitato dal plasmalemma mentre gli altri due da endomembrane (nel caso dei mitocondri risulta esserci una membrana a doppio strato) che presentano canali e trasportatori per lo ione calcio, le caratteristiche di questi canali determinano l’impatto sulla forma dell’onda. Per quanto riguarda i mitocondri sullo strato esterno della membrana abbiamo la presenza di canali anionici voltaggio-dipendenti che hanno una buona permeabilità allo ione calcio, mentre nello strato interno si presenta un canale di calcio molto selettivo solitamente indicato come Ca^{2+} -uniporta.

Le onde di calcio possono essere iniziate stimolando una singola cellula oppure una popolazione di queste, tramite specifici ligandi o specifiche condizioni extracellulari. Il rilascio dello ione Ca^{2+} avviene per mezzo del reticolo endoplasmatico, solo dopo l’attivazione del recettore IP3R e del recettore rianodinico (RyR) per mezzo della produzione dell’enzima inositolo trifosfato (IP3) che viene dalla idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP2) per mezzo della fosfolipasi C (PLC) e dall’attivazione dei recettori G-protein coupled (questi possono essere di vario tipo: purinergici, adrenergici, muscarinici, glutamminergici, GABAergici, istamminergici),(Leybaert & Sanderson, 2012).Inoltre anche il meccanismo molecolare Calcium-Induced-Calcium-Released (CICR) induce un aumento del rilascio dello ione calcio nel citoplasma delle cellule, mediante un feedback-positivo, dovuto all’aumento di concentrazione di calcio nel citoplasma, che opera sui canali del reticolo endoplasmatico inducendo un aumento dell’efflusso dello ione Ca^{2+} .

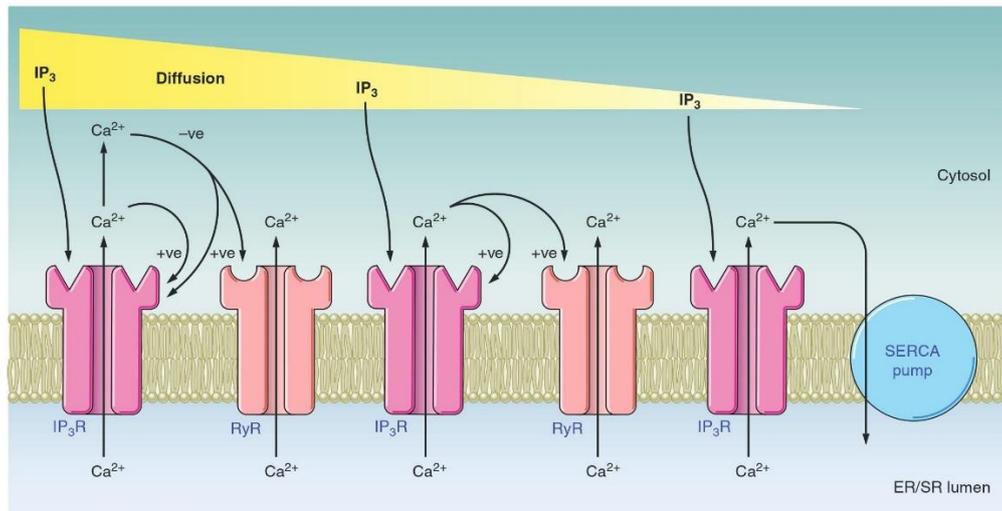


Figura 7 Schematizzazione del rilascio di calcio nel citosol astrocitario tratto da Laybaert L. & Sanderson M. J., *Physiological Reviews*, 2012

Per stabilire la fine di un segnale di calcio è necessario il trasporto attivo contro gradiente di concentrazione degli ioni Ca^{2+} . Sia in cellule eccitabili che non, lo ione calcio può essere espulso nello spazio extracellulare dalle pompe di Ca^{2+}/ATP -asi (PMCA) presenti nel plasmalemma oppure dallo scambiatore Sodio-Calcio (NCX); la prima utilizza direttamente ATP mentre la seconda se ne avvale indirettamente nella forma di gradiente transmembrana del Na^+ . Una volta espulso, grazie al canale ATP-asi del reticolo sarco-endoplasmatico dello ione calcio (SERCA), questo può tornare all'interno dell'ER. Nella maggioranza dei casi, il calo della concentrazione di ioni calcio all'interno dell'ER innesca un influsso secondario di Ca^{2+} inducendo l'apertura dei canali presenti nel plasmalemma in modo tale da riuscire a ripristinare la concentrazione come era prima del passaggio dell'onda. Affinché ciò sia possibile, a livello molecolare si presentano alcuni canali adibiti all'immagazzinamento tra cui lo Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE, la cui funzione e identità non è stata ancora completamente capita) e canali Transient Receptor Potentials (TRP). (Leybaert & Sanderson, 2012)(Verkhatsky et al., 2012).

1.5.3.2 Propagazione del calcio

Ci sono due possibili modi secondo cui le onde di calcio possono essere tramesse da un astrocita all'altro, la prima prevede la mobilitazione di un sistema di secondi messaggeri dal citosol dell'astrocita adiacente (quello a cui

verrà trasmesso l'impulso) attraverso dei canali gap junctions (anche detti giunzioni comunicanti) che permettono il transito dell'IP3 alla cellula vicina così da riuscire a innescare una seconda onda di calcio, mentre la seconda si avvale di un sistema paracrino che utilizza messaggeri extracellulari (Leybaert & Sanderson, 2012).

La prima metodologia fa uso delle giunzioni comunicanti, ovvero array di canali transmembrana che connettono il citoplasma di due cellule adiacenti fornendo un percorso di diffusione tra cellule. Le Gap Junctions sono composte da due semicanali (hemi channels anche conosciuti come connexon) appartenenti ognuno ad una cellula. Ciascun semicanale è composto da particolari proteine dette "connessine", che si possono presentare in varia forma poiché dotate di 21 differenti isoforme nell'uomo. Le connessine utilizzate determinano le caratteristiche fisiologiche della Gap Junctions come ad esempio il profilo di permeabilità.

Esiste tuttavia un altro modo per la trasmissione delle ICWs. Le onde di calcio si possono propagare anche tramite il rilascio di una molecola che funge da segnale nello spazio extracellulare. Una volta che questa si è legata al recettore di membrana presente sulla cellula adiacente si innesca il rilascio degli ioni Ca^{2+} . La prima prova di questo meccanismo di propagazione è stata ricavata dall'analisi dell'esperimento di Hassinger, Guthrie, Atkinson, Bennett, & Kater nel 1996) secondo cui le ICWs erano in grado di propagarsi attraverso una zona libera da cellule.

I due segnali paracrini principali utilizzano come molecola segnale o l'ATP oppure il glutammato, rilasciati durante il passaggio dell'ICWs in un astrocita permettendo il passaggio di quest'ultima nell'astrocita successivo. Una volta rilasciato dalla cellula, l'ATP può attivare sia i canali ionotropici (ATP-gated P2X 1-5) che quelli metabotropici (ATP-gated P2Y). Il segnale di calcio sembra fare più affidamento sulla stimolazione dei metabotropici, piuttosto che sugli ionotropici, in quanto i P2Y attivano i recettori G-protein coupled che a loro volta inducono la stimolazione della PLC permettendo un aumento di concentrazione di IP3 che porta al rilascio del calcio (Bennett, Farnell, & Gibson, 2005).

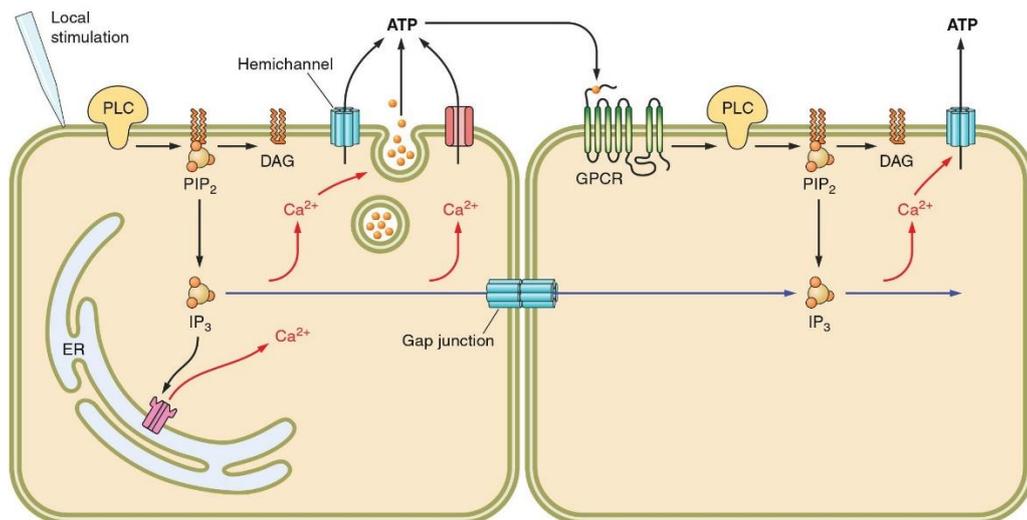


Figura 8 Schematizzazione della trasmissione di un segnale di calcio grazie alla fuoriuscita di ATP e al passaggio di IP₃ attraverso le giunzioni comunicanti, tratto da Leybaert L. & Sanderson M. J., *Physiological Reviews* 2012

Nonostante sia ben chiaro che il passaggio di una ICW porti al rilascio di ATP, non risulta essere del tutto comprensibile come avviene questo procedimento. Infatti esistono molteplici meccanismi che inducono un rilascio di questa molecola, tra cui: il trasporto tramite proteine particolari, la fuoriuscita vescicolare, la diffusione via canali e semicanali (questi ultimi sono dei semicanali di connessine, ad esempio Cx26, Cx36 e Cx43, che non sono riusciti ad accoppiarsi con un altro di una cellula adiacente) (Bowser & Khakh, 2007), riuscire ad esprimere il maggior contributo di un processo piuttosto che un altro non è ancora possibile.

L'ATP non risulta essere l'unica molecola utilizzata dagli astrociti come segnale paracrino per indurre la propagazione delle onde di calcio, infatti queste cellule si avvalgono anche del glutammato. Tramite esperimenti su cellule astrogliali corticali in vitro si è potuto dimostrare come il rilascio di calcio dipendesse anche dalla trasmissione intercellulare di glutammato (Parpura & Fang, 1994).

Il meccanismo principale che regola l'efflusso di questo segnale paracrino è stato dimostrato essere un'esocitosi regolare vescicolare. I tramiti necessari per riuscire nell'esocitosi risultano essere il complesso ternario SNARE e i trasportatori vescicolari di glutammato (Parpura & Verkhratsky, 2012).

È da sottolineare come l'esocitosi vescicolare non sia l'unico meccanismo di rilascio nello spazio extracellulare di glutammato, infatti per giungere a questo

incidono anche diversi fattori quali: un assorbimento inverso da parte dei trasportatori di glutammato della membrana cellulare, l'apertura dei canali anionici indotta da un rigonfiamento cellulare, scambio di questa molecola via antiporta cistina-glutammato, e rilascio sia tramite recettori purinergici ionotropici sia tramite i semicanali precedente descritti.

Dopo essere stato rilasciato dall'astrocita, il glutammato attiva il recettore metabotropico del glutammato mGLUR, situato sulla membrana della cellula adiacente, inducendo l'attivazione della PLC che, tramite il processo visto precedente che comprende la produzione di IP₃, permette il rilascio degli ioni calcio dall'ER.

1.6 ASTROCITI E FISIOPATOLOGIE

Il ruolo degli astrociti nel SNC già ampiamente citato precedentemente risulta chiave di studio anche nell'ambito fisiopatologico, in cui possibili inefficienze di queste cellule possono contribuire alla patogenesi di numerosi disordini cerebrali.

Le prime ipotesi riguardo al contributo delle alterazioni fisiologiche degli astrociti nella patogenesi di alcune malattie risalgono al XIXesimo secolo; Alzheimer, Fromman e Nissl, per primi, studiarono e capirono il ruolo della glia in malattie del SNC, non riuscendo però ad invertire il pensiero comune che le disfunzioni cerebrali derivassero prevalentemente da disturbi neuronali. Questo paradigma neurocentrico prevalse anche nel XXesimo secolo, non portando, però, gli sviluppi sperati per la cura e la terapia di questa tipologia di malattie. Negli ultimi anni, dall'analisi post-mortem di tessuti cerebrali umani e grazie a studi su modelli animali delle patologie del SNC, è stato possibile dimostrare come disfunzioni di cellule astrogliali contribuissero alla patogenesi di diversi disturbi neurologici e disordini psichiatrici.

Una caratteristica comune in molte patologie del SNC è l'astrogliosi, o gliosi, reattiva. Questo processo cellulare consiste in un continuum di cambiamenti molecolari, cellulari e funzionali degli astrociti in risposta alle lesioni del SNC (Dossi, Vasile, & Rouach, 2018); queste alterazioni variano a seconda della gravità della malattia che colpisce il cervello (Anderson et al. , 2014). Uno dei

risultati della gliosi lieve o moderata, generalmente associata a traumi lievi o localizzata in aree lontane dalle lesioni del SNC, risulta essere la quasi assenza di proliferazione astrocitaria. Nelle zone vicine a lesioni o infezioni, al contrario, è presente una forte proliferazione astrocitaria promossa da fattori di crescita epidermici e di fibroblasti, dall'endotelina 1, da ATP, da lipopolisaccaridi e da ossido nitrico (Gadea et al.,2008). Questo forte aumento nella proliferazione causa una commistione e una sovrapposizione dei processi astrocitari interrompendo così i singoli domini di queste cellule.

In alcuni casi, tale reazione astrocitaria può permettere la formazione di una cicatrice gliale compatta, caratterizzata dall'interazione di queste cellule con altre tipologie cellulari principalmente lungo confini di gravi danni ai tessuti come nel caso di tumori, infezioni, neurodegenerazioni croniche o infiltrazioni infiammatorie (Sofroniew et al., 2009). Questi cambiamenti strutturali sono duraturi e persistono fino alla risoluzione della causa scatenante.

E' nota inoltre la funzione protettiva che gli astrociti possono svolgere nel SNC assumendo glutammato eccitotossico e producendo glutazione contro lo stress ossidativo, degradando i peptidi amiloidei e regolando il volume cellulare e l'omeostasi ionica cos' da facilitare la riparazione della barriera ematoencefalica e regolare l'infiammazione del SNC (Dossi et al., 2018).

Tutte queste funzioni che svolgono gli astrociti, incluso anche il processo di astrogliosi, trovano il loro compimento in patologie cerebrali quali: l'epilessia, i tumori cerebrali, la sindrome di Alzheimer, il disturbo depressivo maggiore, e la sindrome di Down.

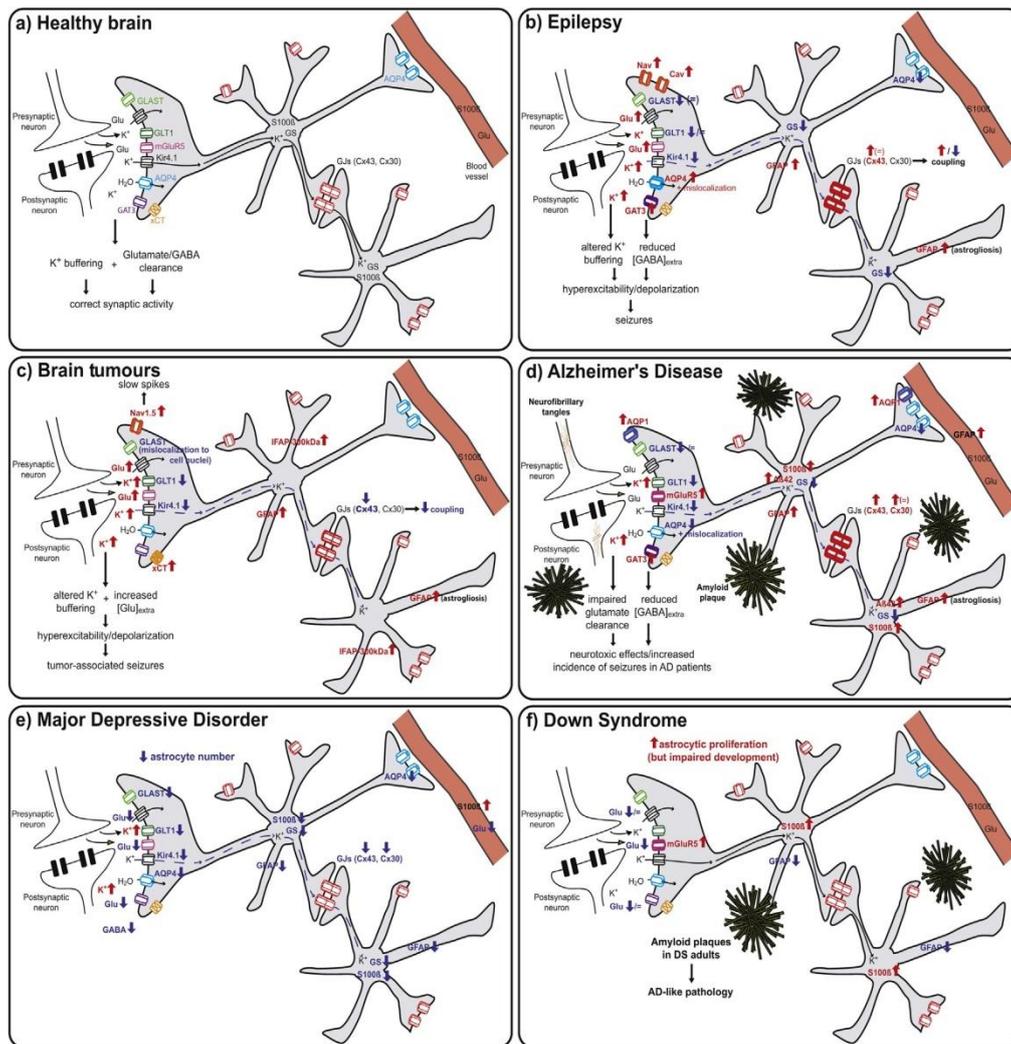


Figura 9 Rappresentazione schematica delle alterazioni degli astrociti in caso di malattie cerebrali. Rapporto tra caso di cervello sano (a) con cervello affetto da epilessia (b), tumore cerebrale (c), sindrome di Alzheimer (d), disturbo depressivo maggiore (e) e sindrome di Down (f) tratto da Dossi et al., *Elsevier*, 2018.

L'epilessia è caratterizzata da crisi ricorrenti e ripetute che perturbano le normali funzioni cerebrali e possono danneggiare il cervello andando a peggiorare preesistenti deficit neurologici. Questa patologia del SNC è stata storicamente attribuita ad un malfunzionamento neuronale, ma grazie alle ricerche negli ultimi 20 anni si è riusciti a proporre anche una base astrocitaria (Tian et al., 2005). Grazie all'analisi di campioni provenienti da pazienti con epilessia del lobo temporale mediale (MTLE) si è riusciti ad identificare un cambiamento nei canali e nei recettori astrocitari, suggerendo così che la disfunzioni di queste cellule può partecipare all'ipereccitazione e alla diffusione delle crisi. Tra i vari meccanismi che vengono alterati nell'epilessia è possibile trovare l'omeostasi dello ione potassio (K^+) e dell'acqua tramite una

variazione nella funzionalità omeostatica dei canali K_{ir} (in particolare i canali K_{ir} 4.1) (Cheveret al., 2010; Djukic et al., 2007) e AQP4 (Nagelhus et al., 2004). Inoltre, un parametro comune in tutte le forme di epilessia risulta essere la presenza di un fenomeno di gliosi, questo è particolarmente evidenziato nel caso di sclerosi ipocampale (HS), lesione associata alla MTLE e alla maggior parte delle tipologie di epilessia. Questa tipologia di malattia cerebrale non si limita a danneggiare solamente questi meccanismi, bensì altera le funzioni omeostatiche di gliotrasmettitori quali il glutammato e il GABA, aumentando in pazienti epilettici la concentrazione extracellulare di queste molecole di 5 volte rispetto al valore basale, e modificando la morfologia delle connessioni astrocitarie così da non permettere una trasmissione intergliale di molecole quali GABA, glutammato e K^+ , così da impedire una crisi epilettica (Dossi et al., 2018).

I tumori cerebrali, invece, derivano maggiormente dai gliomi, che originano dalle cellule gliali e sono classificati in base alle loro proprietà morfologiche (Louis et al., 2007); quelli derivanti da astrociti vengono denominati astrocitomi, che rappresentano il sottotipo più comune per i gliomi cerebrali. Diversi studi hanno evidenziato come le differenze morfologiche e funzionali degli astrocitomi alterassero funzioni quali la regolazione del livello del glutammato extracellulare, riducendo l'espressione dei canali GLT-1, dislocando i canali GLAST, modificando la permeabilità di numerosi canali di membrana, variandone anche il numero (Savaskan et al., 2008). Uno dei recettori la cui espressione risulta essere aumentata è la proteina fibrillare acida (GFAP), per questo motivo la GFAP è utilizzata come marcatore immunostochimico affidabile per riuscire a verificare l'origine astrocitaria di un tumore cerebrale chirurgicamente resecato (Vinters et al., 1998) e non solo come ho visto nel mio periodo di tesi sperimentale e come verrà successivamente presentato in questo mio elaborato come test di immunofluorescenza.

La sindrome di Alzheimer (AD) è il tipo di demenza più comune negli anziani, rappresentando il 60-80% dei pazienti affetti da demenza (Wortmann et al., 2012) è caratterizzata inizialmente da un sottile declino della memoria episodica, che appare come un deficit nel ricordare il passato recente, seguito da un declino più globale delle capacità cognitive, come la perdita di ricordi a

lungo termine, il linguaggio, l'attenzione e i cambiamenti di personalità (QuerfurtheLaFerla, 2010). L'AD è identificata da due segni distintivi istopatologici: il deposito di proteine beta-amiloidi (A β) e da ammassi neurofibrillari (Dossi et al., 2018). La prima ipotesi sulla partecipazione astrocitaria in questa malattia venne suggerita da Alois Alzheimer, che tramite i suoi studi è riuscito a trovare come le cellule gliali fossero in associazione con i neuroni danneggiati. Studi successivi su tessuti umani hanno permesso di dimostrare questa ipotesi mostrando come un'ipertrofia astrocitaria delle cellule associate a placche senili (Nagele et al., 2004). Anche nel caso di sindrome di Alzheimer è stata riscontrata la presenza di astrogliosi tramite l'analisi dell'espressione della GFAP negli astrociti vicino alla placca amiloide, anche se il suo ruolo non è stato ancora completamente compreso (Simpson et al., 2010).

Nelle prime fasi della malattia gli astrociti reattivi sono presenti nella corteccia cerebrale nei pressi delle placche amiloidi negli strati cellulari piramidali. In diverse regioni come la corteccia, l'ippocampo e il cervelletto, i processi astrocitari ipertrofici più vicini ai depositi amiloidei entrano in contatto con questi circondandoli. Questo meccanismo avviene non solo per i depositi amiloidei ma anche per gli ammassi neurofibrillari. Una volta circondati, i processi astrocitari si fondono con essi e contribuiscono alla loro frammentazione e dispersione (Kato, 1998).

Il disturbo depressivo maggiore (MDD), una malattia mentale cronica ricorrente e debilitante, è caratterizzata da umore depresso, perdita di interesse e piacere, variazioni di peso, alterazioni del sonno, difficoltà di concentrazione e istinti suicidi (American Psychiatric Association, 2013).

Numerosi studi hanno rivelato che l'MDD è un disturbo con alterazioni patologiche prominenti, che influenzano la densità, la morfologia, l'espressione proteica e funzionale dei canali di membrana degli astrociti. Tuttavia, i cambiamenti astrocitari nella MDD sono molto diversi da quelli osservati in altre patologie neurologiche e neurodegenerative, come l'epilessia e il morbo di Alzheimer: mentre queste malattie presentano gliosi reattive, formazione di cicatrici gliali e perdita neuronale (Sofroniew & Vinters, 2010), la gliosi e la patologia neuronale prominente non sono presenti nella MDD. Molti studi istopatologici condotti su campioni di cervello post-mortem, hanno rivelato una

notevole diminuzione del numero e della densità di astrociti nei soggetti affetti da MDD rispetto a controlli non psichiatrici abbinati all'età (Cotteretal, 2002). Diverse regioni cerebrali mostrano una ridotta popolazione astrocitaria, come la corteccia prefrontale dorsolaterale (Cotteretal, 2002), la corteccia orbitofrontale (Rajkowskaetal, 1999) e la corteccia cingolata anteriore (Cotteretal, 2001) e l'amigdala (Altshuleretal., 2010). Tuttavia, un aumento della densità delle cellule gliali è stato riportato anche nelle regioni dell'ippocampo e del giro dentato dei pazienti affetti da MDD (Stockmeieretal., 2004). Inoltre, recenti studi di neuroimaging e post-mortem su soggetti depressi hanno rivelato una disfunzione della regolazione astrocitaria dell'omeostasi del glutammato. I soggetti affetti da MDD presentavano livelli inferiori di glutammato, di combinati di glutammato o glutamina (Glx) valutati mediante la spettroscopia a risonanza magnetica in diverse regioni cerebrali come le aree prefrontali (Hasleretal., 2007), il lobo frontale (Yildiz-Yesiloglu & Ankerst, 2006), il giro cingolato anteriore (Mirzaetal, 2004) e l'amigdala (Michaelletal, 2003), enelplasma (Altamuraetal. , 1995).Questi cambiamenti possono tuttavia non apparire omogenei in tutte le aree cerebrali dei pazienti depressi, dal moment che altri due studi hanno riportato aumenti di glutammato nella corteccia occipitale e frontale (Hashimotoetal, 2007), ma questi risultati possono anche dipendere dall'età del paziente e dal livello di cronicità della malattia.

L'omeostasi alterata del glutammato osservata nei pazienti affetti da MDD può anche essere correlata alla ridotta densità astrocitaria rilevata da studi post-mortem su campioni di tessuto cerebrale di pazienti soggetti a MDD. Inoltre, una ridotta espressione di GLAST e GLT-1 si verifica nel giro cingolato anteriore (Choudary et al., 2005), nella corteccia prefrontale dorsolaterale (Choudary et al, 2005) nella corteccia orbitofrontale (Miguel- Hidalgo et al. , 2010), nel locus coeruleus (Chandley et al., 2013) e nell'ippocampo (Medina et al., 2016) dei soggetti a cui è stata diagnosticata la MDD.

La sindrome di Down (DS) è il più comune disturbo cromosomico. La DS è causata dalla trisomia del cromosoma 21, e caratterizzata da ritardo mentale, insufficienza di linguaggio e altre anomalie fenotipiche, come ad esempio strabismo, viso piatto e ipotonia. Inoltre la DS è caratterizzata da un fenomeno simile all'AD, infatti, sono presenti placche neuritiche di A β ampiamente

sviluppate nell'ippocampo e nella corteccia entorinale di quasi tutti gli adulti affetti da DS (Leverenz & Raskind, 1998).

Nonostante il ridotto numero di neuroni, che è dovuto alla proliferazione gravemente compromessa e all'aumentata apoptosi (Contestabile et al., 2007), i cervelli affetti da DS presentano un numero alterato di cellule gliali, in particolare di astrociti.

Gli astrociti in cervelli affetti da DS non sono solo più proliferativi, ma mostrano anche i processi alterati.

I cervelli colpiti da DS mostrano uno sviluppo alterato degli astrociti interlaminari, che inizia normalmente circa a 20-40 giorni dopo la nascita, ma che si manifesta con una rottura per il primo anno di età. Ciò determina una diminuzione del numero di processi interlaminari e una struttura astrogliale immatura, questi due fenomeni possono verificarsi in diverse regioni cerebrali in base alla differente gravità della malattia (Colombo et al., 2005).

1.7 METODOLOGIE DI STUDIO DELLA FISIOLOGIA DEGLI ASTROCITI: LO STATO DELL'ARTE

1.7.1 Colture cellulari

L'eterogeneità cellulare del SNC ha, storicamente, spesso impedito gli studiosi di descrivere le caratteristiche biochimiche di definita alcune popolazioni cellulari sistema del SNC. La separazione di cellule in colture primarie ha rappresentato un vantaggio notevole per alcune popolazione cellulari (McCarthy & Partlow, 1976), valutando le differenze tra colture *in vitro* ed *in vivo* in termini di adesività cellulare, requisiti del mezzo, i fattori di crescita (Mccarthy, 1980). Le prime importanti osservazioni riguardo alla caratterizzazione delle colture cellulari di cellule cerebrali sottolineavano come l'età del tessuto "donatore" non poteva essere troppo avanzata, infatti nel caso dei neuroni, queste cellule non riuscivano a sopravvivere alla dissociazione dei tessuti. Un'altra importante osservazione, relativa alle cellule non neuronali, sottolineava come ad esempio gli oligodendrociti sviluppassero e replicassero in numero sempre maggiore degli astrociti e la stratificazione degli

oligodendrociti si sviluppava rapidamente dopo i primi giorni di coltura, mostrando come questo primo periodo di coltura potesse corrispondere al periodo di proliferazione delle cellule gliali. Perciò per sviluppare colture di astrociti era necessario un metodo per separare questa tipologia di cellule dagli oligodendrociti. Il fatto che gli oligodendrociti potessero crescere sulla superficie della fiasca di coltura in un periodo di poco successivo alla preparazione della coltura indica che queste cellule non richiedono un contatto con gli astrociti per la loro crescita, e che gli oligodendrociti sono presenti nella sospensione iniziale contenenti le cellule cerebrali della cavia analizzata (in questo caso ratti) che non necessariamente sono il risultato di una differenziazione di un precursore cellulare di altro tipo (Mccarthy, 1980).

Comunque, di particolare importanza risultava essere il fatto che in colture sviluppate da tessuti nervosi prenatali gli oligodendrociti non potevano essere identificati prima di un periodo di 7-10 giorni di crescita cellulare, suggerendo che la sospensione originale conteneva precursori oligodendrogliali la cui differenziazione morfologica non era ancora avvenuta (Mccarthy, 1980).

Numerosi e differenti sono stati gli approcci per poter separare gli astrociti dagli oligodendrociti, una parziale separazione delle due specie è stata raggiunta schizzando energicamente la superficie di una coltura mista con il mezzo di coltura (Mccarthy, 1980), grazie a questo metodo venivano rimossi un maggior numero di oligodendrociti rispetto a quello di astrociti. Ripiastrando la sospensione cellulare ottenuta, si è potuto notare come l'adesione cellulare si manifestava già dopo circa 1h, inoltre la differenza del numero di cellule tra astrociti e oligodendrociti fu annullata in poco tempo in quanto la prima tipologia di cellule proliferare molto più velocemente della seconda (Mccarthy, 1980). dalla fiasca di coltura originaria, inoltre, saranno presenti maggiormente gli astrociti rispetto agli oligodendrociti, questo vantaggio permette di poterla utilizzare dopo un periodo di tempo tale che la proliferazione astrocitaria ripristini la quantità degli astrociti precedentemente rimossi (Mccarthy, 1980). Uno dei successi parziali di questa tecnica risiede nel fatto che la rimozione fisica degli oligodendrociti può avvenire senza influenzare l'attacco degli astrociti alla superficie della fiasca di coltura.

Per poter preparare le colture cellulari di ratto posso essere utilizzati diversi protocolli, ad esempio per riuscire ad isolare astrociti corticali di ratto si

trasferiscono i tessuti cerebrali corticali dei ratti in fiasche Falcon, per poi idratarli con un mezzo di coltura. Storicamente per riuscire ad ottenere una coltura cellulare pura di astrociti era necessario applicare un protocollo di separazione tra astrociti e oligodendrociti, il consisteva in diversi passaggi. Per prima cosa si estraevano dal cervello della cavia le cellule cerebrali per poi depositarle in una fiasca Falcon, per poi idratarle con un mezzo di coltura, il quale veniva successivamente cambiato a 9 giorni dall'estrazione. A 10 giorni dall'estrazione avvenivano 3 risciacqui con il mezzo di coltura in modo tale da rimuovere eventuali cellule flottanti che non avevano aderito alla superficie della fiasca, per poi mettere per 2 ore in incubazione la fiasca contenente queste cellule. Successivamente la fiasca subiva un processo di centrifuga per la durata di 12 ore a 250 rivoluzioni per minuto (rpm) in modo tale da sospendere le cellule nella soluzione. Una volta ultimata questa operazione le cellule in sospensione venivano raccolte e filtrate grazie ad un filtro Nitex 33. A questo punto si ottenevano un filtrato composto da oligodendrociti in sospensione in maggioranza e una minor quantità (in percentuale molto bassa) di astrociti, e una fiasca contenente uno strato quasi intatto di astrociti con una bassa presenza di oligodendrociti sulla superficie della fiasca. Per poter ultimare il processo di separazione e quindi ricavare una coltura primaria quasi totalmente pura di astrociti, si aggiungeva il mezzo di coltura per evitare che le cellule potessero seccarsi e quindi morire, in seguito la fiasca veniva agitata vigorosamente manualmente in modo da rimuovere gli oligodendrociti rimasti tramite un cambio di mezzo. Dopo 5 risciacqui con il mezzo di coltura, gli astrociti venivano estratti dalla fiasca per poi venire ri-piastrati su un'altra (Mccarthy, 1980).

1.7.2 La tecnica del patch-clamp

Con il termine "Patch-Clamp" si indica una tecnica elettrofisiologica che permette di bloccare ed isolare il voltaggio di una parte della membrana della cellula o anche dell'intera cellula così da poter studiare le singole correnti ioniche che passano attraverso i singoli canali situati nel punto della membrana che abbiamo isolato. Le correnti che vengono registrate sono di ordini

piccolissimi pari a pico Ampere (pA). Questa particolare tecnica può essere utilizzata su colture cellulari e cellule isolate.

La tecnica del patch-clamp utilizza solo un microelettrodo che serve sia per variare il potenziale che per misurare la corrente che attraversa la membrana; possiamo studiare sia la corrente che attraversa i canali ionici che sottostanti l'apertura dell'elettrodo che quelli che sono presenti su una parte o su tutta la membrana.

Questa metodologia di analisi fu sviluppata da due biofisici tedeschi: Erwin Neher e Bert Sakmann tra il 1976 e il 1981, che li portò a vincere il premio Nobel in Fisiologia e Medicina nel 1991 *“per le loro scoperte sulla funzione dei singoli canali ionici cellulari”*.

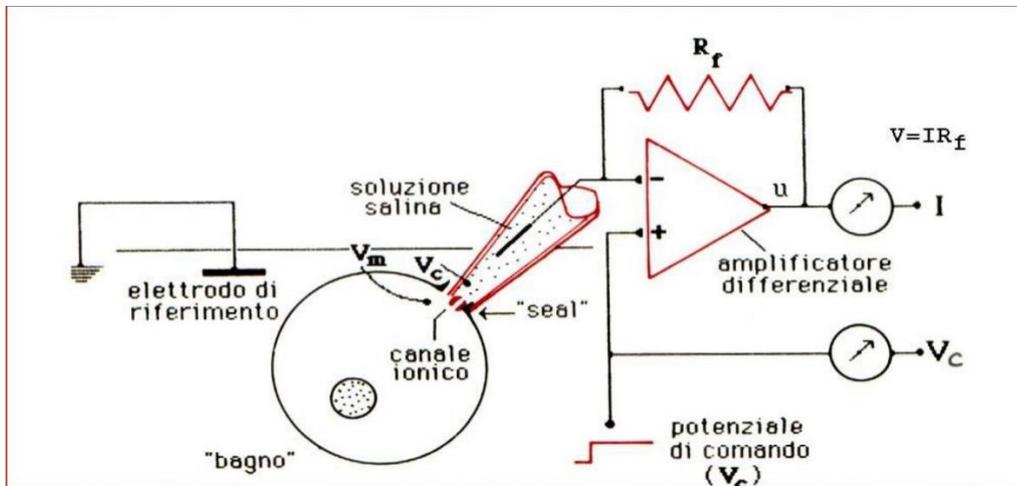


Figura 10 Schematizzazione della tecnica del Patch-Clamp

L'attività dei singoli canali ionici, quindi, è stata studiata a partire dagli anni '70, questo avviene attraverso il blocco della differenza di potenziale in una piccola area della membrana che permette di isolare i canali ionici fornendo dati sui segnali cellulari. Gli studi di Neher e Sakmann furono il punto di partenza di una serie di altri esperimenti e prove che nelle membrane fossero localizzati canali ionici, tutte le informazioni furono ricavate da esperimenti sulle giunzioni neuromuscolari dei muscoli scheletrici, sede della liberazione dell'acetilcolina (Ach), le quali a loro volta stabiliscono un legame con i propri recettori e fanno passare una corrente elettrica attraverso la membrana della placca terminale. L'instaurarsi di una differenza di potenziale fa registrare

l'apertura di un canale ionico che si richiude con il distacco dell'acetilcolina stessa (Neher,Sakmann).

La tecnica del patch-Clamp deriva dallo sviluppo e dal perfezionamento di un'altra metodologia di analisi, ovvero il *voltage-clamp* utilizzato per determinare quando canali ionici si aprono e si chiudono, essendo dotato di un circuito di blocco in modo tale da impedire la mutua interazione tra apertura/chiusura dei canali voltaggio-dipendenti e potenziale di membrana. Grazie a questo è possibile misurare una corrente trans membrana negli esperimenti di blocco di voltaggio (ovvero ponendo la differenza di potenziale costante durante l'esperimento) riuscendo a dividere e capire le varie componenti capacitive e ioniche, sfruttando l'utilizzo di de elettrodi. La metodologia del Voltage-clamp, però, possiede diversi limiti. Infatti, tra le varie restrizioni del Voltage-clamp si annoverano le difficoltà di isolare perfettamente il contributo elettrico di un singolo canale ionico e il rapporto SNR (*Signal to Noise Ratio*, ovvero il rapporto segnale/rumore) tra la corrente passante per il canale analizzato e il rumore (segnale di background bianco) che veniva osservato. Per poter risolvere tali problematiche sono state apportate modifiche prima di tutto agli elettrodi impiegati per la registrazione, sostituendole con micropipette di vetro il cui diametro della punta possiede è circa 1 μm e la sua resistenza variabile tra i valori di 1 e 10 MegaOhm ($\text{M}\Omega$). Per riuscire invece a migliorare il parametro del rapporto segnale/rumore è parso subito evidente migliorare la resistenza del sigillo (seal) tra la punta del patch e la membrana cellulare, infatti se la pipetta risulta essere solo appoggiata alla membrana allora la maggior parte degli ioni in uscita, tramite i canali, si disperdono andando così ad alterare la misurazione della corrente. Per riuscire quindi a far aderire completamente l'elettrodo alla membrana, Neher e Sarkmann pensarono di applicare una lieve pressione negativa, attraverso una suzione in grado di far aderire la membrana alla pipetta (Hamill, Marty, Neher, Sakmann, & Sigworth, 1981). Grazie a questo procedimento si ha la formazione di quello che viene definito "Giga-seal", ovvero una resistenza di sigillo di un ordine che spazia tra i 10 e i $20 \cdot 10^9$ (per questo appunto Giga) Ohm. Numerosi studi di patch-clamp in vitro ed in situ hanno portato alla identificazione delle correnti ioniche astrogliali sopradescritte fondamentali nella regolazione omeostatica degli astrociti. Tuttavia, il patch-clamp non

consente di ottenere **informazioni riguardanti gli eventi funzionali che si verificano ad esempio nei micro domini dei pedicelli astrocitari. Questo dato spinge verso la necessità di sviluppare altre metodologie elettrofisiologiche quali quelle di registrazione extracellulare.**

1.7.3 Registrazione extracellulare

Nonostante gli astrociti non siano cellule in grado di generare un potenziale d'azione, la loro eccitabilità e depolarizzazione della membrana risulta essere rilevante per funzioni tra cui il rilascio e l'assorbimento di neurotrasmettitori (Zorec et al., 2012). L'attività extracellulare di cellule elettrogeniche è solitamente registrata tramite l'utilizzo di multielettrode arrays (MEAs) con elettrodi planari su un substrato direttamente in contatto con le cellule in coltura. Grazie a questa tecnologia si è riusciti a registrare la generazione e la trasmissione dei potenziali d'azioni nei neuroni. Per riuscire a migliorare il rapporto SNR (*Signal to Noise Ratio*) e la risoluzione spaziale vengono utilizzati dei filtri passa-alto apposti con frequenza di taglio pari 1 kHz.

Le cellule gliali non generano potenziali d'azione, bensì esibiscono oscillazioni del potenziale di membrana. Per riuscire a misurare queste piccolissime oscillazioni è stato necessario riuscire ad implementare un detector basato su larghi elettrodi in modo da sfruttare la capacità del doppio strato elettrico (Rocha et al., 2016). Piccoli voltaggi extracellulari provenienti dalle cellule adese all'elettrodo inducono una corrente di rimozione che è amplificata dal fattore di guadagno della capacità del doppio strato elettrico, permettendo così la registrazione dell'attività elettrica della cellula gliale.

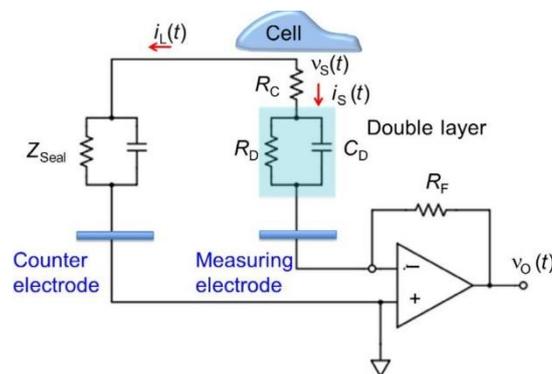


Figura 11 Circuito equivalente dell'elettrodo utilizzato per la registrazione extracellulare tratto da Rocha et al., 2016 Science Advances

Per riuscire ad avere un MEAs utile alla registrazione di potenziali elettrici piccoli è necessario che l'impedenza d'ingresso dell'elettrodo, di solito costituito da oro o platino, sia il più bassa possibile, in modo tale da avere un rapporto segnale/rumore adeguato. È molto difficile riuscire ad ottenere un MEAs a bassa impedenza e con una sezione micrometrica, le ultime ricerche si sono soffermate sull'aumentare la superficie effettiva dell'area modificando l'elettrodo con materiali porosi conduttivi come platino nero, nanostrutture di oro, nanotubi di carbonio e polimeri conduttivi. Modificando la superficie, l'impedenza risulterà essere diminuita e quindi la registrazione migliore.

Con questo approccio il livello di rumore è ridotto ad un valore di $0.3 \mu\text{V/pp}$ (microVolt picco-picco), anche se le informazioni spaziali vengono perse a causa della grandezza dell'area in punta d'elettrodo.

Analizzando la totalità del sensore, è possibile vedere come questo include due elettrodi circolari, uno svolge la misura mentre l'altro viene utilizzato come elettrodo contatore.

Il circuito in figura mostra la struttura dell'accoppiamento tra la cellula e l'elettrodo. Questo circuito è una versione semplificata del modello standard utilizzato in letteratura (Eversmann et al., 2003; Obien, Deligkaris, Bullmann, Bakkum, & Frey, 2015), e fa uso dell'accoppiamento elettrico tra il double layer sviluppato con un'interfaccia metallica o elettrolitica. La rete equivalente è formata dalla resistenza di carica trasferita (R_D) e dalla capacità del doppio strato elettrico posti tra loro in parallelo, e in serie con la resistenza di spread (R_C). Per quanto riguarda, invece, l'elettrodo di conteggio si utilizza un circuito simile, formato da un'impedenza di sigillo (Z_{seal}) molto elevata in parallelo, con una conduttanza. Infine, la resistenza posta in retroazione è necessaria per poter diminuire i rumori e migliorare il rapporto SNR.

Grazie ad alcuni esperimenti di registrazione extracellulare tramite MEAs su cellule astrocitarie provenienti da colture cellulari, è stato possibile registrare variazioni di voltaggio in uno spettro di frequenza di 100-600 Hz, dopo stimolazione elettrica (Fleischer, Theiss, Slotta, Holland, & Schnitzler, 2015). Dalle prove effettuate è stato possibile concludere che le oscillazioni di potenziale registrate sono innescate dall'attivazione di canali di calcio voltaggio dipendenti (Ca_v), evocati da un influsso di cationi attraverso i canali permeabili a ioni di notevoli dimensioni, come ad esempio NMDG^+ (Fleischer

et al., 2015). I canali che rispondo a questa caratteristica sono dei sottotipi dei canali P2X (Fleischer et al., 2015).

Inoltre, la metodologia di analisi MEAs ha permesso la registrazione dell'attività elettrica di gliomi in ratto (Rocha et al., 2016). Infatti, nonostante le cellule di glioma non risultino essere elettrogeniche, queste possono manifestavano una notevole variazione di potenziale elettrico. Riuscire a registrare queste variazioni, però, non risulta essere molto semplice, in quanto sono presenti rumori a bassa frequenza dovuti alla scarsa adesione cellulare sull'elettrodo. Tramite l'utilizzo di inibitori specifici, è stato dimostrato che questi potenziali transmembranari che venivano registrati da elettrodi a bassa impedenza potevano essere dovuti a canali ionici sensibili a variazioni di pH extracellulari, che inducono il flusso di ioni sodio attraverso i canali suddetti. Per poter dimostrare questo, è stata effettuata una prova di acidificazione del terreno di coltura cellulare (Rocha et al., 2016), individuando un'attività elettrica spontanea causata appunto, secondo gli autori, dall'acidificazione dell'ambiente extracellulare. Essa potrebbe essere responsabile *in vivo* dell'alterazione della funzionalità della rete neuronale in prossimità della massa tumorale, contribuendo alle crisi in pazienti affetti da glioma (Rocha et al., 2016). Tuttavia, vi sono alcune riserve su come questi dati possano essere assimilabili ad una reale situazione in vivo. Infatti, l'acidificazione indotta era davvero estrema.

1.7.4 Calcium imaging

Esistono una moltitudine di segnali di calcio che vengono usati da diverse tipologie di cellule, dai microdomini di Ca^{2+} fino alle onde dello stesso ione che si propagano negli astrociti (Berridge 2006). Questa diversità spiega come non esista una sola tecnica per monitorare tutte le variazioni di Ca^{2+} , tuttavia, le metodologie di imaging tramite l'utilizzo di indicatori fluorescenti risultano essere la miglior applicazione per l'analisi di questi segnali. Grazie all'utilizzo di un'appropriata tecnologia e di indicatori adatti si riescono a misurare variazioni sia subcellulari che multicellulari. Le modalità di imaging utilizzate possono essere varie e spaziano dalla microscopia confocale a quella a campo

largo (wide-field) includendo la total internal reflection (TIRF). Comunque, i dettagli degli esperimenti dipendono dal tipo di cellula, dal sistema di imaging e dalla caratteristica del segnale di calcio analizzato (Bootman, Rietdorf, Collins, Walker, & Sanderson, 2014).

Al fine di ottenere una buona analisi è necessario scegliere accuratamente l'indicatore in base al segnale di Ca^{2+} che si vuole misurare, all'importanza di avere dati quantitativi o qualitativi, all'hardware di imaging disponibile, e ai potenziali problemi che potrebbero insorgere. Uno dei concetti principali sottostanti l'utilizzo di indicatori sta nel fatto che un aumento/decremento eccessivo della loro fluorescenza può alterare la concentrazione di calcio, proprio per questo motivo è importante riconoscere che il cambiamento di questo colorante è una funzione anche di altri fattori tra cui: la sua concentrazione, la localizzazione citosolica e la lunghezza dell'eccitazione. Se uno di questi fattori viene alterato si causa una variazione di fluorescenza indipendentemente dalla presenza di un segnale di calcio. Variazioni della concentrazione dell'indicatore derivano da fenomeni quali: photbleaching, estrusione o compartimentazione dell'indicatore; inoltre altri cambiamenti come quello del pH o della viscosità possono alterare le proprietà del colorante usato.

Gli indicatori fluorescenti sensibili al Ca^{2+} possono essere suddivisi in due categorie quali: raziometrici (dual-wavelength) o single-wavelength in base alla loro risposta in seguito ad una variazione di concentrazione di questo ione; i primi vengono utilizzati per lo più per misure quantitative della concentrazione di calcio mentre è più comune usare i secondi per misure qualitative su variazioni relative di Ca^{2+} (Minta et al., 1989). Uno svantaggio dei raziometrici rispetto ai single-wavelength risulta essere che il loro range dinamico è più piccolo rispetto agli altri, a questo rimedia presentando un'onda di eccitazione o emissione, chiamata "isobestic point", che risulta essere insensibile allo ione calcio. Questa ci permette di misurare la concentrazione dell'indicatore.

Per poter far riflettere ad una variazione di fluorescenza un cambiamento di concentrazione dello ione si rende la misurazione tramite single-wavelength molto più precisa e molto più utile per rilevare variazioni relative dello ione calcio. Nonostante questo colorante non permetta di valutare in maniera

quantitativa la concentrazione di calcio, un modo pratico per correggere un indicatore di fluorescenza non costante è quello di esprimere il segnale di fluorescenza durante l'esperimento in rapporto con il segnale di fluorescenza all'inizio di questo definendolo come F/F_0 . Questo approccio permette inoltre di normalizzare i risultati ottenuti e di renderli paragonabili con altri esperimenti.

Una considerazione chiave per la selezione dell'indicatore sta nel range di concentrazione di Ca^{2+} da misurare durante l'esperimento. Idealmente la costante di dissociazione (K_d) dell'indicatore sta nel punto medio del range atteso, infatti la funzione che regola la relazione tra K_d e la concentrazione di calcio risulta essere lineare in un intorno di questo punto medio. Al di fuori di esso grandi cambiamenti dello ione calcio rappresentano solo piccole variazioni di fluorescenza. Per questo è necessario porre attenzione all'affinità dell'indicatore a questa costante, se questa risulta essere eccessivamente bassa allora non si riuscirà a rilevare piccole variazioni di concentrazione dello ione calcio, mentre invece sarà adatta per grandi cambiamenti, il contrario si manifesterà se l'affinità risulta essere troppo elevata.

Per quanto riguarda possibili danni che si possono arrecare alle cellule una menzione di riguardo merita l'esposizione ai raggi luminosi per osservare i risultati degli esperimenti. Come è ben noto, i raggi UV possiedono molta più energia rispetto alla luce visibile, se questa risulta essere eccessiva la nostra cellula si danneggia in maniera irreversibile, per evitare ciò vengono scelti coloranti che si eccitano alla luce verde o rossa (Bootman et al., 2014).

Vi sono inoltre alcuni fenomeni come il photobleaching che causano un'irreversibile perdita di fluorescenza. Questo fenomeno risulta essere il maggior problema per quanto riguarda esperimenti che necessitano di una lunga durata o di una rapida acquisizione dell'immagine. Il motivo principale dell'insorgenza di questo problema è dovuto alla reazione che si instaura tra l'indicatore e l'ossigeno durante lo stato eccitato che comporta la formazione di una molecola non fluorescente. Una continua perdita di colorante può compromettere l'acquisizione del segnale di calcio e la sua precedente calibrazione (Scheenenetal., 1996).

L'imaging dei segnali di calcio richiede uno scambio tra diversi fattori quali la risoluzione dell'immagine, il rate dell'acquisizione e il grado di intensità

dell'eccitazione. Solo per esperimenti di breve durata è possibile ottenere una grande risoluzione ad alta velocità con una forte illuminazione.

Una chiave determinante per le performance ottiche di qualsiasi microscopio è la lente usata come obiettivo. In particolare, la massima risoluzione spaziale di un microscopio è direttamente proporzionale al numero di apertura (NA) sulla lente. Per la microscopia a fluorescenza la potenza di illuminazione è direttamente proporzionale alla quarta potenza di NA e inversamente proporzionale alla radice dell'ingrandimento. Per quanto riguarda invece la microscopia confocale possiamo vedere che questa viene utilizzata per lo più per monitorare i segnali di calcio subcellulari attraverso lenti con alto NA. Mentre se l'esperimento richiede di visualizzare segnali di calcio globali all'interno delle cellule allora risulta essere più appropriata una lente che risulta avere sia un NA minore ma ciò che va particolarmente diminuito è l'ingrandimento. Infine, per analizzare oscillazioni del calcio nelle singole cellule si utilizzano lenti che non possiedono una grande discriminazione spaziale bensì hanno un campo visivo più largo riuscendo così a monitorare contemporaneamente più cellule.

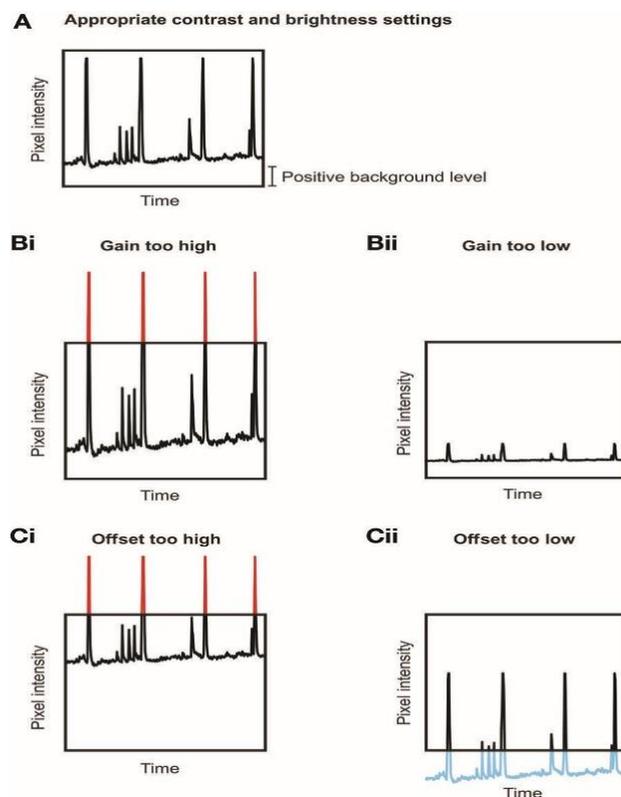


Figura 12 Effetti dello scorretto aggiustamento dei parametri di guadagno e offset durante l'esame del Calciumimaging tratto da Bootman et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014

Quasi tutti gli apparecchi di imaging hanno sistemi di controllo sulla sensibilità dei fotoni di luce che gli arriva. Questi vanno implementati accuratamente in modo tale da usare una quantità appropriata di bit depth quando si cattura l'immagine. È necessario regolare questo parametro (bit depth) la discriminazione di diversi segnali di calcio di differenti ampiezze. Il bit depth indica il numero di livelli che un sistema può utilizzare per quantificare il range dell'intensità luminosa all'interno di un'immagine. Uno dei metodi principali per assicurare un uso appropriato del bit depth è il controllo sul guadagno per la camera/PMT (ovvero il cosiddetto contrasto). Questo parametro va modificato prima della realizzazione dell'esperimento in modo tale da assicurare una giusta amplificazione del segnale da parte del detector. Un ultimo sistema di controllo di cui è dotato detector è il controllore di offset. Questo determina il valore di intensità luminosa di base che un detector deve registrare, al di sotto del quale evita la registrazione. Al fine di facilitare la selezione dell'offset e del contrasto la maggior parte dei sistemi provvedono di dare una tabella all'utilizzatore (look-up table, LUP) per informarlo a quale intensità i pixel risultano essere saturi e a quale invece non presentano nulla. Una volta registrato il segnale si può procedere con l'analisi dei dati. Il metodo di analisi dipende ovviamente dalla tipologia di questi (Bootman et al., 2014). Questo procedimento si esprime con la rimozione dei segnali di background (rumori e autofluorescenze) e la normalizzazione o calibrazione della fluorescenza.

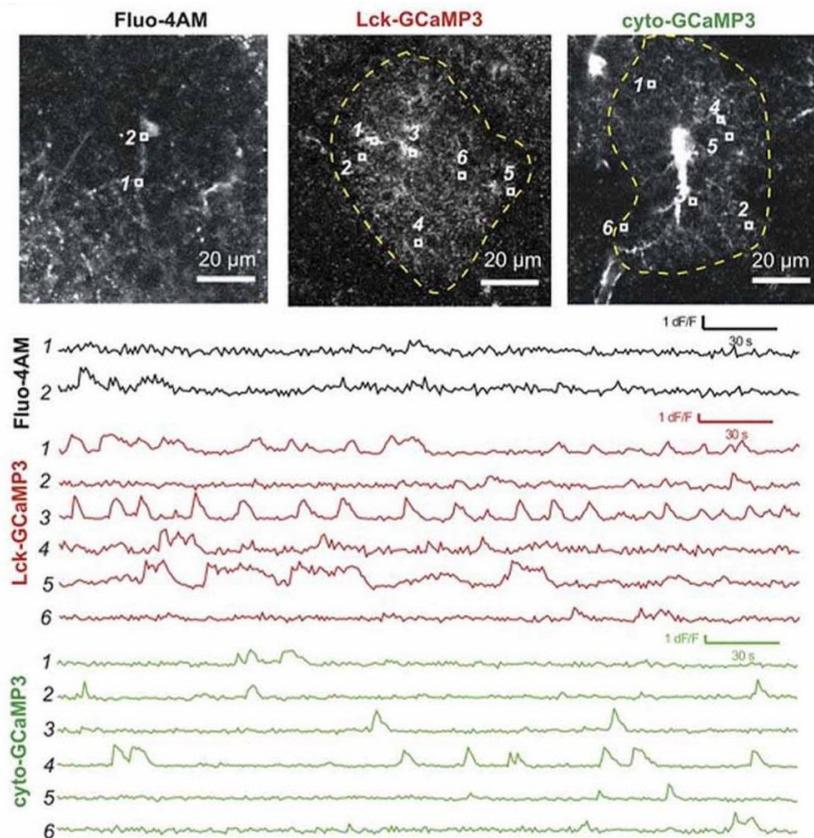


Figura 13 Segnali di calcio rappresentati con Fluo-4 (tracce nere), cyto-GCaMP3 (tracce verdi), e Lck-GCaMP3 (tracce rosse). Sopra, immagini rappresentative di astrocyti additivati con Fluo-4AM, Lck-GCaMP3 o cyto-GCaMP3, tratto da Dongdong L. et al., *Frontiers*, 2013

Per quanto riguarda la calibrazione della fluorescenza, questa risulta essere uguale sia nel caso di indicatore single-wave che nel caso di quelli raziometrici e comporta la misurazione dell'intensità della fluorescenza in condizioni di saturazione del calcio durante l'appropriata eccitazione o emissione delle onde. Una volta rimosso il background l'immagine ottenuta può essere razionalizzata tra le due appropriate immagini ($F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$) se viene utilizzato un indicatore dual-wave. Mentre se l'analisi è avvenuta tramite l'uso di un single-wave l'immagine finale viene normalizzata con quella finale come descritto sopra (tramite la formula F/F_0).

La metodologia d'analisi del calcium imaging risulta essere abbastanza recente, in quanto per poter monitorare le ICWs in situ è stato necessario sviluppare un upgrade della microscopia confocale dando così vita alla microscopia a due fotoni (Li, Agulhon, Schmidt, Oheim, & Ropert, 2013). Questa tipologia di microscopio semplifica il cammino ottico e riduce i problemi strumentali legati all'allineamento risultanti nel confocale. Per poter analizzare, però, le

oscillazioni di calcio nei pedicelli astrocitari sono necessari ulteriori aggiustamenti poiché la risoluzione spaziale si dimostra limitata (Chaigneau et al., 2011). Per riuscire a migliorare questo parametro, la microscopia a due fotoni viene combinata con la metodologia necessaria a superare il limite di diffrazione STED (Stimulated Emission Depletion) (Nägerl and Bonhoeffer, 2010) aumentando così la risoluzione spaziale e laterale e ricavando delle immagini dettagliate anche dei dendriti *in vivo* (Berning et al., 2012).

2 SCOPO DELLA RICERCA

Fin dalla dimostrazione del potenziale d'azione i neuroni sono sempre stati considerati come le cellule eccitabili e pertanto le uniche funzionalmente significative per la fisiologia del sistema nervoso. Solo a partire dagli anni '80 si è potuto dimostrare che anche gli *astrociti*, avessero un'attività elettrica intracellulare dovuta allo spostamento transmembrana di ioni di diverso tipo, tra i quali soprattutto gli ioni Ca^{2+} e K^{+} .

Una crescente branca delle neuroscienze ha dimostrato che la glia influenza direttamente la capacità di generazione di segnali neuronali, modulando localmente e globalmente l'attività della rete cerebrale (Salatino, Ludwig, Kozai, & Purcell, 2017). In particolare gli astrociti, ricoprono un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi ionica ed idrica, e nella regolazione del volume cellulare influenzando con la loro attività l'eccitabilità neuronale e la velocità di trasmissione degli impulsi (Pannasch & Rouach, 2013). Inoltre, alcuni studi (Dossi et al., 2018) hanno dimostrato come una disfunzione degli astrociti possa generare la patogenesi di malattie e disturbi neuronali quali il morbo di Alzheimer, epilessia e tumori cerebrali, aggiungendo dunque un'ulteriore motivazione alle ricerche di quest'ambito.

Tuttavia, le metodologie allo stato dell'arte per lo studio della fisiologia astrogliale sono state sviluppate principalmente per studiare i neuroni. Questo dato potrebbe aver limitato la nostra capacità di comprensione dei meccanismi fondamentali che regolano la funzionalità astrogliale e il loro malfunzionamento in numerose neuropatologie. In questo contesto, lo studio di cellule in vitro potrebbe avere grande rilevanza nell'avanzamento della conoscenza dei principi biofisici e molecolari che regolano la fisiologia e fisiopatologia astrogliale. Tuttavia, come descritto le proprietà morfologiche, molecolari e funzionali delle cellule in astrogliali coltura sono molto diverse da quelle osservate in vivo.

Sulla base di queste premesse il laboratorio dove ho svolto il mio periodo di tesi sperimentale, si occupa da anni dello sviluppo di materiali nano strutturati, biomateriali e dispositivi bioelettronica avanzati che consentano di differenziare gli astrociti "*in vitro*" in modo tale che possano esprimere le

proprietà morfologiche, molecolari e funzionali il più possibile simili a quelle osservate “*in vivo*”, e di studiare e modulare le loro proprietà elettrofisiologiche. Durante il mio lavoro di tesi mi sono occupato di partecipare a queste ricerche con lo scopo di acquisire le nozioni teoriche e pratiche per testare la biocompatibilità e la funzionalità degli astrociti su interfacce nano strutturate innovative.

I dati ottenuti nello sviluppo di questa linea di ricerca potranno essere di notevole importanza per sviluppare dispositivi utili per studiare e comprendere la fisiologia e la fisiopatologia degli astrociti e quindi anche del SNC.

3 MATERIALI E METODI

3.1 COLTURE PRIMARIE DI ASTROCITI CORTICALI DI RATTO

Per colture primarie si intendono tutte quelle colture cellula ricavate da un tessuto sia di origine animale che umana. Le cellule una volta isolate, sono in grado di compiere un numero finito di divisioni cellulari *in vitro* fino a raggiungere uno stato detto di *confluenza*. Queste linee cellulari hanno un tempo di sopravvivenza limitato. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati secondo la legge Italiana riguardo la protezione degli animali da laboratorio con l'approvazione della commissione bioetica locale del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna e sotto la supervisione della commissione veterinaria per la salute degli animali all'Università di Bologna. Ogni esperimento è stato svolto per riuscire a minimizzare il numero degli animali usati e la loro sofferenza.

Per la procedura di estrazione e di coltura di astrociti sono stati impiegati ratti CD SPRAGUE-DAWLEY (Charles River, Italia), secondo l'utilizzo di un protocollo standard (Mccarthy, 1980), che implica l'estrazione degli astrociti il giorno stesso della nascita o al massimo il giorno dopo (p0-p1).

La preparazione è stata effettuata in ambiente sterile lavorando sotto una cappa a flusso laminare con filtri HEPA in grado di proteggere il campione dall'operatore e dall'ambiente circostante e viceversa.

Le cellule ricavate dalla corteccia cerebrale, privata delle meningi e di fibroblasti, sono state asportate rimuovendo la testa del ratto dal resto corpo per poi sterilizzarla grazie dell'etanolo posto all'interno di un becher, in seguito questa è stata fissata ad un basamento di cera con un ago in modo tale da praticare nella maniera più precisa possibile un'incisione a T sulla testa del ratto. Grazie a delle forbici a farfalla si è proseguito aprendo la scatola cranica. Una volta fatto ciò grazie ad un altro bisturi è stata asportata la parte del cranio precedentemente tagliata Per rimuovere il più possibile le meningi e quindi i fibroblasti presenti in esso è stato utilizzato un tampone di cotone. Infine, grazie ad una piccola spatola si è andato a prendere la parte superiore della corteccia per poi depositarla all'interno di una provetta in cui era presente il

mezzo di coltura 15% FBS. L'ultimo passaggio prevede la dispersione delle cellule all'interno di fiasche di polistirene, la cui superficie è trattata chimicamente in modo da renderla idrofila e negativamente carica.

Il mezzo di coltura utilizzato per raccogliere il materiale della dissezione era costituito da DMEM (Gibco-BRL) supplementato con siero fetale bovino (FBS 15 %, Gibco-BRL) contenente numerosi fattori di crescita, L- glutammina (2 mM) (Gibco-BRL) e penicillina (100-200 U/ml) – streptomicina (100 µg/ml) (Gibco –BRL).

Questo mezzo di coltura favorisce la crescita degli astrociti, ma non la crescita e la vitalità dei neuroni corticali che potrebbero essere estratti con il prelievo.

Il mezzo viene poi cambiato regolarmente ogni due (massimo tre) giorni, in modo da garantire un ambiente cellulare stabile e adatto alla proliferazione cellulare. Il mantenimento delle colture è avvenuto in un incubatore a 37° C in ambiente saturo di acqua con il 95% di aria e CO₂ al 5%, l'ambiente è stato reso umido di modo da garantire il sistema tampone necessario alle cellule per sopravvivere. Trascorsi tre giorni si effettuava il primo cambio del mezzo di coltura, mentre dalla seconda settimana il mezzo veniva cambiato ogni due giorni.

3.1.1 La piastratura di astrociti

La prima fase di piastratura degli astrociti è caratterizzata dalla tripsinizzazione, ossia il distacco delle cellule dalla superficie della fiasca una volta raggiunta la confluenza in seguito ad un risciacquo con soluzione salina, si procede con l'aggiunta di 1 ml di tripsina in incubazione per 5 minuti. Le cellule trasferite in una provetta vengono centrifugate per 10 min a 960 rpm.

Infine, si procede con la rimozione del surnatante e con l'aggiunta di 1ml di mezzo in cui le cellule verranno risospese per procedere con la deposizione delle cellule sopra i campioni dopo la conta cellulare.

Per la procedura della conta cellulare, nel laboratorio dove ho svolto il mio periodo di tesi sperimentale, si è utilizzato il metodo della cameretta di Burker. Questo consta in un piccolo portaoggetti sul quale sono incise tre scanalature che dividono la parte centrale in due aree che risulteranno essere le camere di

conta. Nella parte centrale è stato montato un vetrino che verrà fissato grazie agli appositi morsetti, il quale lascerà uno spessore di circa 0.1 mm nel quale andremo ad inserire una goccia del mezzo precedentemente preparato in cui vi sono gli astrociti che verranno contati. Le camere di conta sono suddivise in 9 quadrati più piccoli grazie a tre linee ravvicinate, i quali sono a loro volta suddivisi in 12 quadrati da una linea sottile. Successivamente si procede facendo la media del numero di cellule localizzate sulle due diagonali della camera di conta. Una volta ricavato questo viene moltiplicato per 250000 e diviso per 24 in modo da trovare il numero di cellule per ml ($n = (\text{mediacellule} \times 250000)/24$). Infine, per riuscire a ricavare il volume di sospensione cellulare da piastrare si utilizza l'espressione

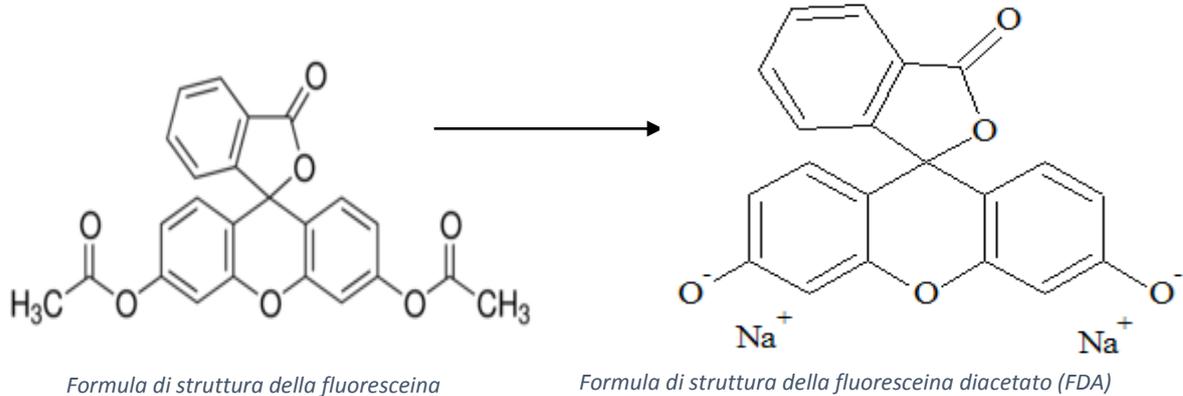
$$X = \frac{\text{concentrazione cellulare}}{n}$$

3.2 TEST DI VITALITA' CELLULARE: FDA ED ALAMAR BLUE

FDA (Fluoresceina Diacetato) è un indicatore utilizzato per i test di vitalità cellulare, la molecola è un composto di anelli benzenici sia aromatici che non aromatici, alla cui estremità sono presenti due esteri. Il test di vitalità del FDA sfrutta l'azione degli enzimi esterasi presenti sulla membrana delle cellule, l'attività di questo enzima è presente solo nelle cellule vive e consta nella rottura dei legami tra i gruppi benzene e i 2 gruppi esteri all'estremità, permettendo così alla cellula di manifestare autofluorescenza emettendo luce verde, invece qualora le cellule fossero morte questo gruppo proteico non agisce lasciando la molecola FDA non fluorescente sulla superficie cellulare, in quanto nella forma diacetata della fluoresceina (ovvero la forma comprendente anche i due gruppi esteri) non avviene il legame.

Per visualizzare anche i nuclei cellulari in blu è stato aggiunto una soluzione 1:2000 di Hoechst 33342 in Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS). Successivamente i campioni sono stati risciacquati con DPBS in modo da rimuovere FDA in eccesso.

L'osservazione avveniva con un microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse I80, con un obiettivo 20X, ed un filtro specifico FITC, filtro nel verde e DAPI nel blu).



L'AlamarBlue (AB) (Sigma Aldrich) è un indicatore di crescita fluorimetrico/colorimetrico che sfrutta l'attività metabolica cellulare per rilevare un indice di vitalità e proliferazione cellulare. Il nome di questo test deriva dal colorante adoperato, una forma ossidata dell'indicatore redox, questo presenta una colorazione blu e non risulta essere fluorescente; quando posto in incubazione con cellule vive è possibile riscontrare, attraverso strumenti di misura per la fluorescenza e l'assorbanza (ThermoScientificVarioskan Flash MultimodePlate Reader), come la colorazione viri dal blu a rossa e fluorescente.

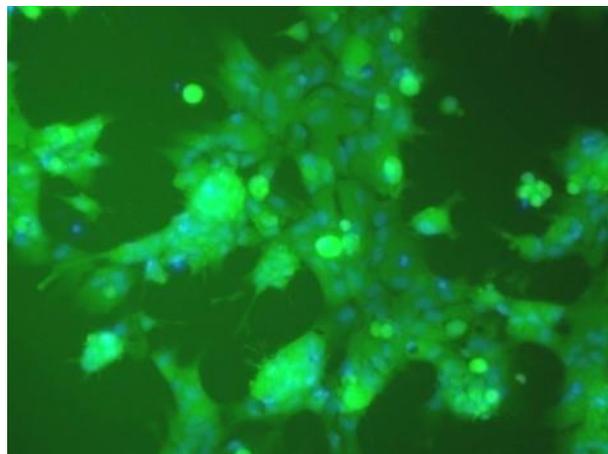


Figura 14: 20X FDA a 5 DIV di astrociti piastrati su un substrato di poli-D-lisina (PDL)

Numerosi risultano essere i vantaggi associati all'utilizzo di questo reagente: innanzitutto il colorante mostra un cambiamento di fluorescenza nell'intervallo di riduzione/ossidazione relativo alla riduzione metabolica cellulare, in secondo luogo è stato dimostrato come l'indicatore risulti essere non tossico per le cellule; inoltre il colorante produce un cambiamento chiaro, distinto e stabile risultando così di facile interpretazione.

Il reagente AB è stato aggiunto direttamente al mezzo di coltura (10% v/v) in ogni campione. Dopo 6 ore di incubazione, sono stati trasferiti in una piastra da 96 pozzetti, 100µL di soluzione contenente AB prelevati dai nostri campioni, 100µL di soluzione AB 10% completamente ridotta (controllo positivo), 100µL di soluzione Alamar blue ossidato (controllo negativo), 100µL di mezzo completo (DMEM, 15% di FBS e 1% di penicillina). Ogni esperimento veniva ripetuto in triplicato per una corretta indagine statistica.

Per la misura della fluorescenza e dell'assorbanza è stato utilizzato un Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode Plate Reader

3.3 IMMUNOFLUORESCENZA E MICROSCOPIA FLUORESCENTE

Per l'immunofluorescenza i nostri campioni venivano fissati con paraformaldeide al 4% dopo tre risciacqui con il tampone fosfato salino (PBS) veniva aggiunto Tryton X-100 allo 0,3% in PBS, per permeabilizzare le cellule. Successivamente è stato aggiunto 1% di BSA in PBS così da bloccare i siti aspecifici, in modo tale che l'anticorpo si possa legare ai siti specifici. Di seguito le cellule venivano incubate in ambiente umido con un anticorpo primario (1:200) per 3 ore e dopo tre risciacqui con PBS state venivano nuovamente incubate in ambiente umido con l'anticorpo secondario (1:1000), Per l'analisi è stato utilizzato un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse I80, questa tipologia di microscopi sfrutta le capacità della sostanza in esame di assorbire energia ad una data lunghezza d'onda e a sua volta emetterla sotto forma di luce fluorescente visibili con l'impiego di appositi filtri. Per questa

metodologia di analisi viene impiegato un fascio di luce in campo ultravioletto (UV) che irradia i campioni eccitandoli.

Il microscopio consta dei seguenti componenti: una lampada a vapori di mercurio (ordine di grandezza della lunghezza d'onda pari ad 1 \AA ovvero $0,1\text{nm}$) che scaldata emette radiazioni in una fascia tra il visibile e l'UV, nei pressi della sorgente luminosa risiede un primo filtro di eccitazione che ha il compito di selezionare l'intervallo di lunghezze d'onda del fascio di luce, successivamente abbiamo uno specchio diecrico che riflette il fascio sull'oggetto dell'analisi passando attraverso l'obiettivo. Una volta irradiato, il campione emetterà a sua volta una radiazione luminosa che verrà registrata dal detector solo dopo essere stata difratta dallo specchio diecrico.

Le immagini sono ottenute in campo scuro presentando una risoluzione maggiore rispetto a quella ottenuta con un microscopio ottico dovuto al fatto che le lunghezze d'onda in campo UV risultano essere più piccole.

3.4 ANALISI WESTERN BLOT

Per effettuare l'analisi Western Blot sono stati presi campioni contenenti $25\ \mu\text{g}$ totali di proteine i quali sono stati separati in un gel SDS-poliacrilammide, sviluppato tramite polimerizzazione e composto da due tipologie sovrapposte di gel (gel stacking e gel separating), e elettrotrasferiti su membrane nitrocellulose (Bio-RadLaboratories), in seguito sono state bloccate con una soluzione 5% BSA in PBS contenente 0,05% Tween 20 e incubate tutta la notte a 4°C con un anticorpo primario Kir4.1 (1:400, AlomoneLaboratories, Gerusalemme, Israele), AQP4 (1:500, Santa Cruz Biotchnology) e Cx43 (1:500, Sigma Aldrich) e anticorpo secondario Horseradish Perossidasi-coniugato IgG (Sigma). In seguito, sono stati svolti dei lavaggi in PBS per poi analizzare le membrane mediante un'analisi in chemiluminescenza ad alta definizione con l'utilizzo di un ChemiDoc XRS (Bio-RadLaboratories).

3.5 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE

Per determinati esperimenti è stato utilizzato un microscopio elettronico a scansione (SEM) FEG Hitachi S4000. Questa tipologia di microscopi non

utilizza la luce come sorgente di radiazioni, bensì fa uso di un fascio di elettroni primari che vanno a colpire il campione. Questo fascio è generato da una sorgente elettronica, tramite l'utilizzo dell'effetto termoionico, concentrato da una serie di lenti elettromagnetiche e deviato dalla lente obbiettivo, formata da un insieme di bobine che permettono la scansione delle varie parti del campione.

Una volta colpita la superficie in esame, il fascio elettronico primario genera dei fasci elettronici secondari e diffusi, i quali vengono registrati da un insieme di rivelatori che li converte in impulsi elettrici, i quali vengono inviati ad un monitor dove viene rappresentata l'immagine acquisita. Questa risulterà essere in bianco e nero mostrando una notevole risoluzione e un'elevata profondità di campo. Per poter funzionare, l'analisi al SEM necessita di una camera di vuoto in cui porre l'oggetto dello studio, portandolo a pressioni di circa 10^{-4} - 10^{-5} mbar. Inoltre, è necessario che il campione sia conduttivo, in modo tale da generare il fascio di elettroni secondario, e deve essere collegato a massa in modo tale da evitare un possibile accumulo di cariche che possa alterare l'analisi. I campioni non conduttivi possono essere comunque osservati con questo microscopio purché rivestiti con appositi film metallici e disidratandoli appositamente. Per questo, gli astrociti piastrati su PDL e film di HTlc sono stati fissati con una soluzione 2,5% di glutaraldeide in PBS a 4°C, per un'ora. Successivamente sono stati sottoposti ad 1% di tetrossido di osmio (OsO_4) a temperatura ambiente; in seguito, i campioni sono stati disidratati con lavaggi con soluzioni al 50%, 75%, 95% e 99% di etanolo, prima della deposizione di oro (spessore di 10 nm) in modo da rendere possibile l'analisi al SEM (FEG Hitachi S4000).

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 IDROTALCITI

I composti di idrotalciti (HTlc), definiti anche come “anionic clays” (argille anioniche) o idrossidi lamellari a doppio strato, sono un particolare famiglia di materiali stratificati consistenti in più strati carichi positivamente con interstrati anionici necessari al mantenimento della neutralità elettrica totale. La grande rilevanza tecnologica e scientifica delle HTlc è verificata da diversi fattori quali la densità di carica degli strati, che può essere calibrata, la variabilità degli elementi che li compongono e l’alta stabilità chimica (Rivers, 2003). Questi enormi vantaggi, insieme alla bassa tossicità ed ad una buona biocompatibilità (Posati et al., 2012), rendono le HTlc una tipologia di solidi stratificati molto interessante, che trova applicazione in numerosi ambiti tra cui: le scienze mediche (Nocchetti et al., 2013), i nanocomposti polimerici (Posati et al., 2014), dispositivi fotonici e opto-elettronici nonché sensori (Bolognesi et al., 2013).

Le idrotalciti presentano una formula chimica del tipo $[(M^{2+})_{1-x}(M^{3+})_x(OH)_2]^{x+}[(A^{n-})_{x/n}yH_2O]$ dove M^{2+} è un catione bivalente di Magnesio (Mg), Nichel (Ni), Zinco (Zn), Rame (Cu) o Cobalto (Co), mentre M^{3+} è un catione trivalente di Alluminio (Al), Cromo (Cr), Ferro (Fe) o Gallio (Ga), A^{n-} , invece, è l’anione n-valente che serve a bilanciare la carica positiva, infine, y è il numero di molecole di acqua interlamellari, ovvero comprese all’interno del reticolo.

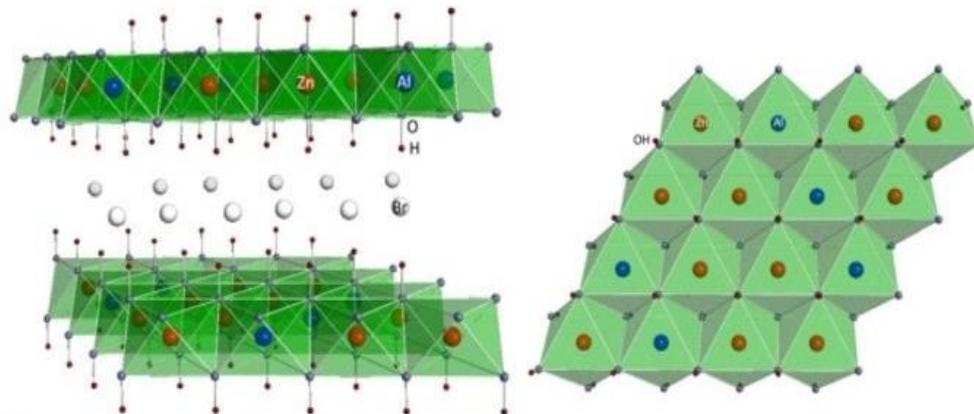


Figura 15a Struttura chimica del $[Zn_{0.72}Al_{0.28}(OH)_2]Br_{0.28} 0.69 H_2O$ tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016

È stato possibile ottenere film sottili caratterizzati dalla dispersione colloidale delle nanoparticelle di Zn-AlHTlc procedimento attraverso un procedimento di dropcasting o gocciolamento che permette dunque la formazione di sottili film nanostrutturati. Nello specifico i film di HTlc ZnAl $[Zn_{0.72}Al_{0.28}(OH)_2]Br_{0.28} \cdot 0.69 H_2O$ alla concentrazione di 1 mg/mLuna veniva depositata su una coverslip 19mm (Figura 16b).

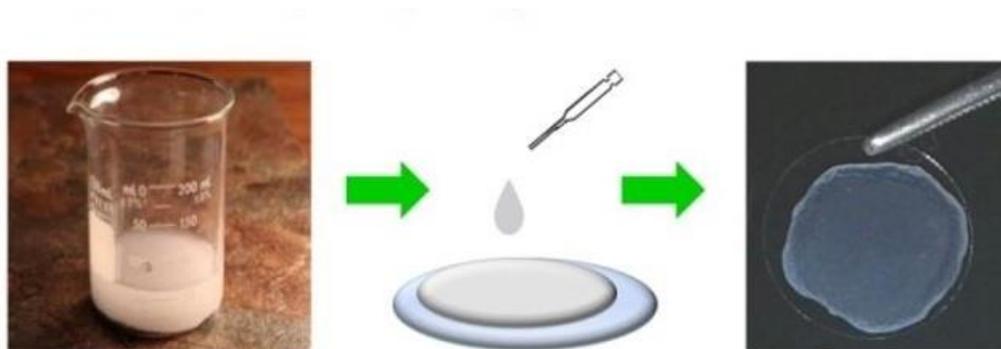


Figura 15b Schematizzazione della procedura di gocciolamento usata per ottenere film di HTlc dalla superficie nanostrutturata tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016

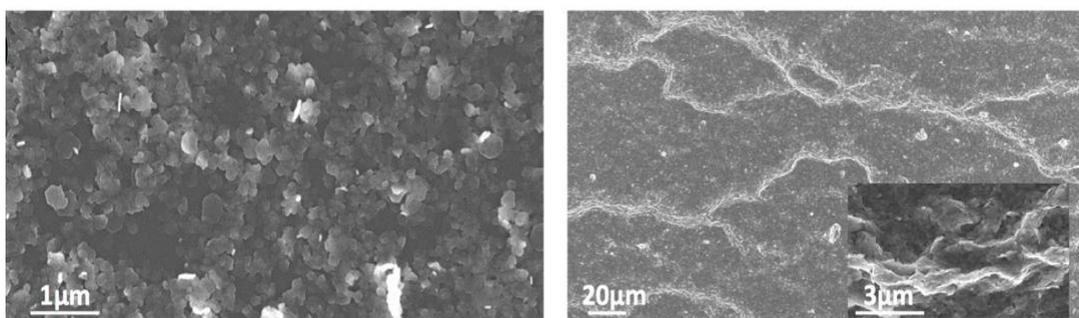


Figura 15c Immagini al microscopio elettronico della superficie nanostrutturata del HTlc dalla formula sopra riportata tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016

Come osservato precedentemente (Posati et al., 2012) la dispersione acquosa colloidale di HTlc, avente dimensioni nanometriche, ha un'alta tendenza a formare spontaneamente film. La formazione di pile dense di nanocristalli di HTlc risulta in strutture allungate nelle quali i singoli nanocristalli si aggregano lungo una data direzione.

Questo comportamento può essere ricondotto alla migrazione degli aggregati di particelle di HTlc durante la lenta evaporazione in seguito a deposizione ed assumono la tipica forma allungata.

4.2 FILM NANOSTRUTTURATI INDUCONO IL DIFFERENZIAMENTO DEGLI ASTROCITI IN VITRO

I risultati ottenuti nel laboratorio dove ho svolto il lavoro di tesi hanno dimostrato che la crescita di astrociti sulla superficie nano strutturata delle HTlc, induceva un differenziamento morfologico delle cellule di astrociti corticali di ratto rispetto alla morfologia presentata su un substrato controllo di Poli-D-Lisina (PDL), dove astrociti presentano una morfologia poligonale piatta tipica di tali cellule in coltura primaria. Il differenziamento evidenziato sui substrati di HTlc favorisce una morfologia allungata e stellata, tipica degli astrociti osservati *in vivo*, con lunghi processi dipartono dal corpo cellulare (Posati et al., 2016). Tale effetto non risulta essere riconducibile ad una reazione infiammatoria gliotica come osservato da una normale espressione della proteina fibrillare acida (GFAP), marker caratteristico della astrogliosi.

Per determinare inoltre, l'impatto dei substrati di HTlc sulla crescita di cellule astrogliali, È stato effettuato il test di vitalità cellulare con fluoresceina diacetato (FDA) a 3,7 e 15 div. Dall'osservazione al microscopio confocale (Figura 16a, b, c, d) è emerso che, mentre gli astrociti piastrati su PDL presentassero una forma poligonale, quelli piastrati su HTlc mostrassero un elevato differenziamento. Inoltre, di particolare importanza risulta essere, la distribuzione delle cellule che si distribuiscono seguendo una direzione specifica (indicata in figura 16 dalle frecce)

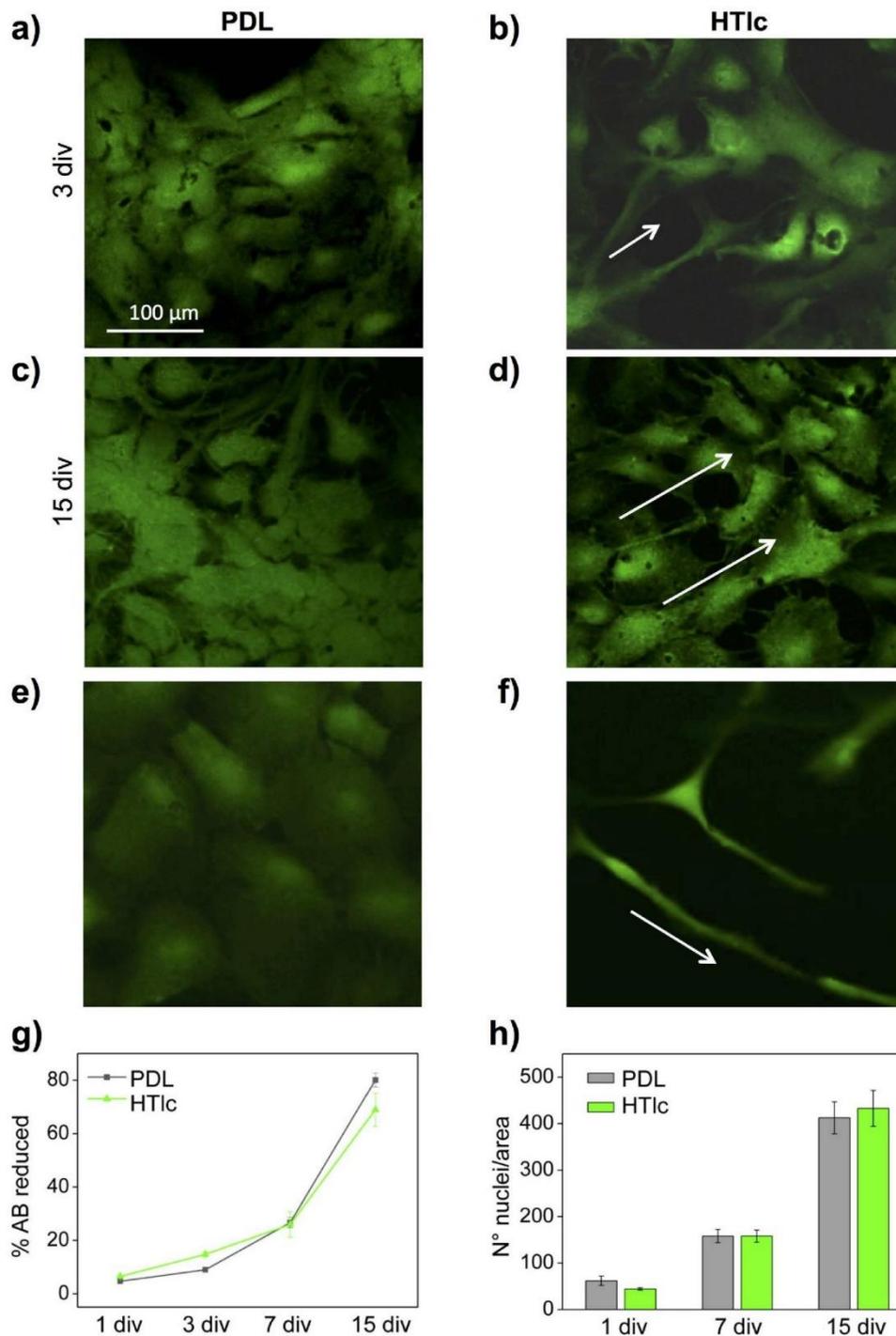


Figura 16 a-f) Immagini al confocale 20X di astrociti piastrati su PDL (a,c,e) e su HTlc (b,d,f), a 3 div (a,b) e 15 div (c,d); (e,f) minor densità di astrociti a 7 div, mostra comunque un differenziamento su HTlc. g) Alamar Blue assay di vitalità cellulare per astrociti piastrati su PDL e HTlc a 1,3,7,15 div. h) L'istogramma mostra il numero di nuclei cellulari su PDL e HTlc per area ad 1,7, 15 div tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016.

Come mostrato in Figura 16g, è stato successivamente effettuato il test di vitalità cellulare Alamar Blue. La percentuale di astrociti differenziati è stata determinata su PDL e HTlc misurando il rapporto tra l'asse verticale ed orizzontale di ogni cellula, considerando differenziata ciascuna cellula in cui

l'asse verticale fosse almeno il doppio di quello orizzontale. La percentuale di cellule differenziate si è rivelata maggiore a 7 div in numero 5 volte superiore rispetto al valore ottenuto sul substrato di PDL (Tabella 1).

	3 div	7 div
PDL	21% ± 2	10% ± 3
HTlc	27% ± 4	52% ± 2

Tabella 1 Percentuale di differenziamento degli astrociti piastrati su PDL e HTlc tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016

Dall'analisi SEM è emerso come gli astrociti fossero ancorati al substrato ed interagissero direttamente con le nano strutture di HTlc depositate sui film, il differenziamento fenotico degli astrociti su tali substrati è promosso senza alcuna alterazione gliotica.

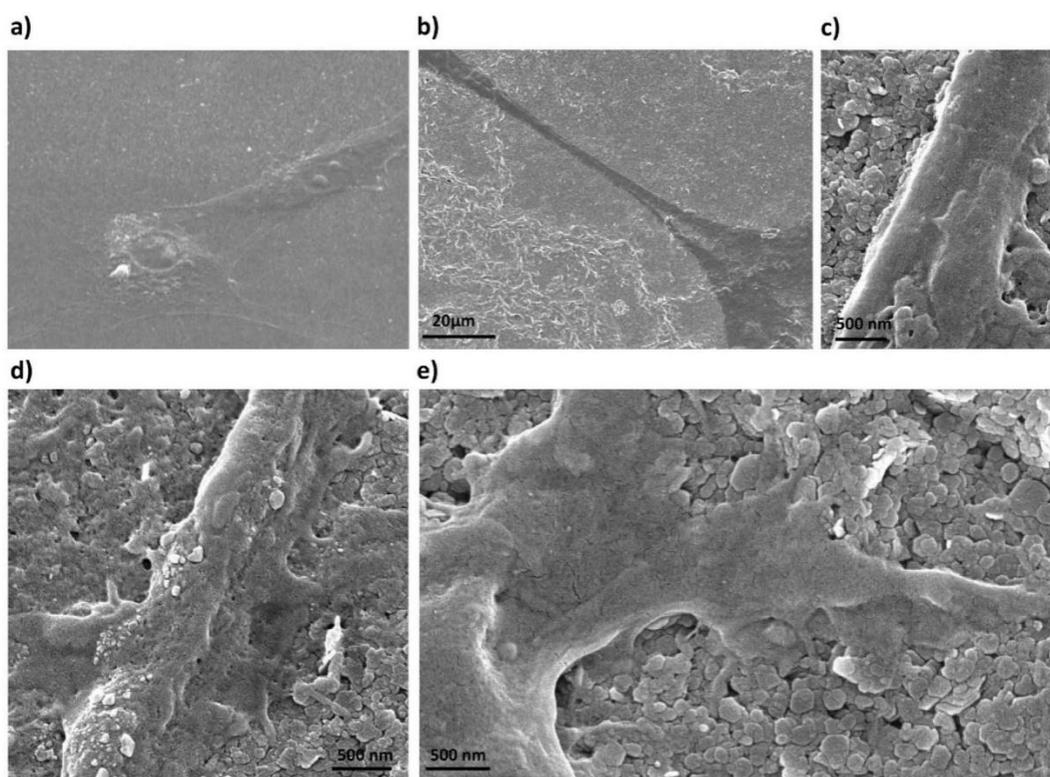
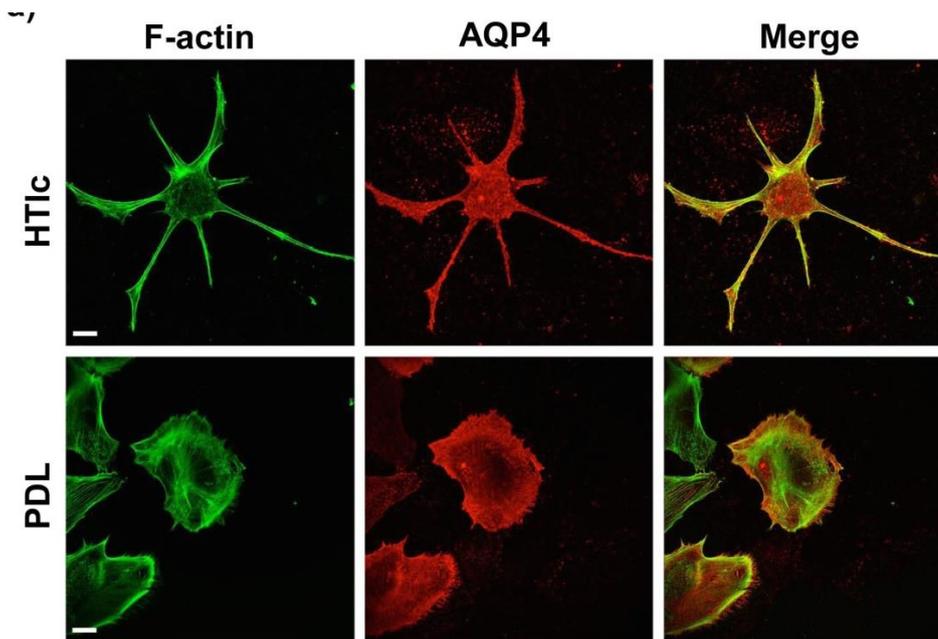


Figura 17 Immagini SEM di cellule piastrate su PDL (a) e HTlc (b); con ingrandimenti maggiori sono state evidenziate le strutture allungate dei processi astrocitari e come i prolungamenti dei pedicelli si sono attaccate alle nanopiastrine di HTlc tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016.

4.3 LA CRESCITA DI ASTROCITI SU SUBSTRATI NANOSTRUTTURATI INDUCE L'ESPRESSIONI DI CANALI IONICI E ACQUAPORINE SULLA MEMBRANA DEGLI ASTROCITI

Come è noto, canali ionici ed AQP4 sono fondamentali per l'omeostasi astrogliale (Valentina Benfenati et al., 2011), la co-localizzazione dell'espressione dei canali $K_{ir}4.1$ e AQP4 in astrociti piastrati su HTIc e su PDL come dalla mostrato in figura 18 dimostra che le cellule con morfologia differenziata cresciute sulle superficie nanostrutturate mostravano una marcata espressione di entrambe le proteine nella membrana plasmatica nei pedicelli astrogliali e una co-localizzazione con le fibre di actine in prossimità della membrana cellulare (Figura 18, merge).



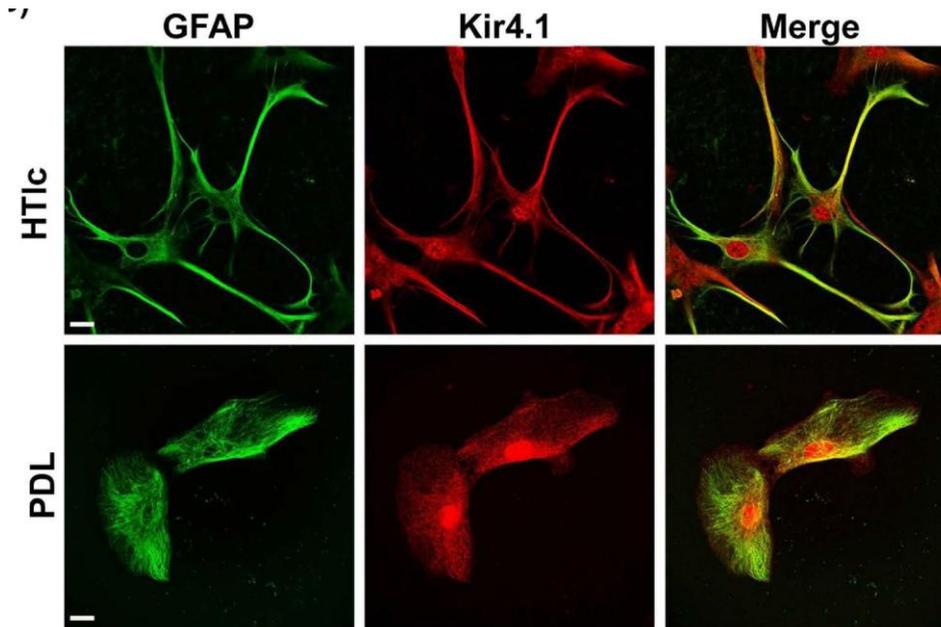


Figura 18 Immagini al microscopio confocale 20X per l'espressione delle proteine AQP4 e Kir4.1 in astrociti piastrati sul substrato d'analisi (HTlc) e quello di controllo (PDL) tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016.

La relativa quantificazione (Figura 19) di AQP4 (Figura 19a) e di Kir4.1 (Figura 19b), dimostra come questi risultassero particolarmente over-espressi in cellule adese su substrati di HTlc rispetto ai controlli. Kir4.1 la banda espressa in cellule cresciute su substrati nanostrutturati a di 50 kDa (figura 19b) corrisponde alla banda espressa nella membrana plasmatica in astrociti (Valentina Benfenati, Caprini, Nobile, Rapisarda, & Ferroni, 2006). Questi risultati indicano che la crescita di astrociti su HTlc induce una sovra-regolazione dell'espressione delle proteine AQP4 e Kir4.1 e dei loro modelli di distribuzione nei pedicelli astrocitari della membrana cellulare.

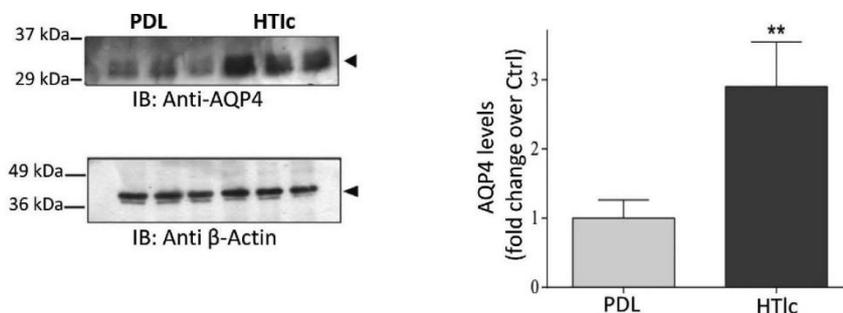


Figura 19a Analisi Western blot e quantificazione dell'espressione della proteina AQP4 in astrociti piastrati su PDL e HTlc tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016.

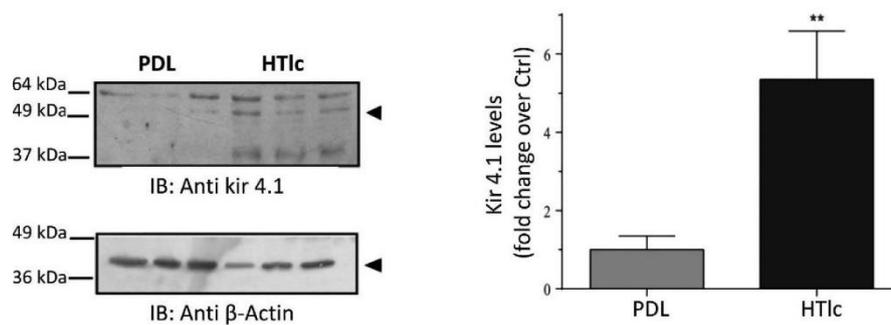


Figura 19b Analisi Western Blot e quantificazione dell'espressione della proteina $K_{ir}4.1$ in astrociti piastrati su PDL e HTlc tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016.

In precedenti studi svolti da Nicchia et al., è stato mostrato come le cellule astrogliali cambiassero la loro morfologia indipendentemente dall'espressione del canale AQP4, e quindi che la localizzazione di questo canale sulla membrana plasmatica è un effetto secondario legato al rimodellamento del citoscheletro di actina, quindi strettamente legato alla morfologia cellulare (Nicchia et al., 2008), i risultati indicano che il re-arrangiamento del citoscheletro di actina è il responsabile dell'induzione di un differenziamento morfologico e della sovra-regolazione dei canali ionici in astrociti piastrati su HTlc.

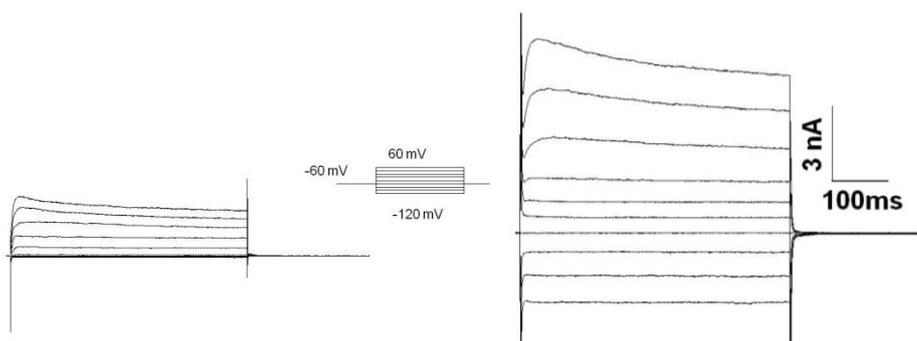


Figura 20 Proprietà funzionali di astrociti piastrati su substrati di PDL che dimostrano avere una conduttanza voltaggio dipendente outward rectifying di K^+ (pannello a sinistra) ed astrociti piastrati su substrati nanostrutturati di HTlc che mostrano una conduttanza inward rectifying in risposta ad uno stimolo di iperpolarizzazione tratto da Posati et al., *Scientific Reports*, 2016.

Per analizzare le dipendenze dal voltaggio e dal tempo della conduttanza espressa dalle cellule piastrate su substrati nanostrutturati e di controllo, gli astrociti sono stati stimolati per 500 ms ad ogni step da un valore di potenziale

a -120 mV fino ad un valore di+ 60 mV, aumentando il voltaggio di 20 mV ad ogni step (Figura 20), le curve rappresentative ottenute, e mostrate in figura 6, da cellule piastrate su substrati di PDL e HTlc, mostrano la risposta delle cellule al voltaggio applicato. Correnti rapide attivanti, non-attivanti, e voltaggio-dipendenti dell'intera cellula sono state ricavate grazie al protocollo di step di voltaggio a potenziali più positivi rispetto a -4 mV in astrociti piastrati su PDL (Figura 20 pannello di sinistra). Invece, in risposta allo stesso protocollo di step di voltaggio, correnti inward a potenziali di membrana negativi sono state registrate sulle cellule piastrate sul substrato nanostrutturato (Figura 20 pannello di destra), le quali erano attivate completamente per 50 ms e la cui inattivazione non dimostrava alcuna dipendenza dal tempo.

4.4 NANOFILI DI SILICIO

Sulla base dei precedenti risultati, durante il mio periodo di tesi sperimentale, sono stati valutati gli effetti di substrati nanostrutturati, su dei nanofili di silicio (SiliconNanoWires, SiNWs) così strutturati:

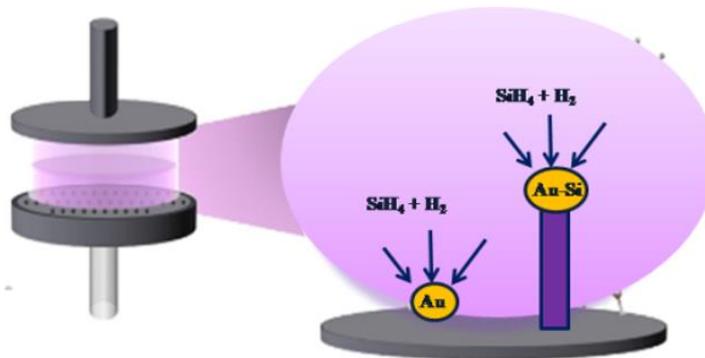


Figura 21 Schematizzazione del processo di fabbricazione mediante PECVD di nanofili di silicio (per cortesia della Dott.ssa Annalisa Convertino, CNR-IMM, Roma)

La sintesi di questi biomateriali nanostrutturati è avvenuta, in collaborazione con l'istituto IMM del CNR di Roma dalla Dott.ssa Annalisa Convertino, mediante il processo di deposizione chimica assistita dal plasma (PECVD), secondo il quale è possibile formare film nanometrici portando il materiale dallo stadio gassoso a quello solido. Il plasma è un gas in cui una significativa

percentuale di atomi o molecole vengono ionizzati mediante un apporto di energia tramite dei generatori RF o DC ad una frequenza di alimentazione standard uguale a 13,56 MHz.

Gli scaffold e in seguito i materiali sono stati depositati utilizzando una miscela di idrogeno (H_2) e silano (SiH_4) ad una pressione pari ad 1 Torr (ovvero 133,32 Pa) e ad una temperatura di 330 °C.

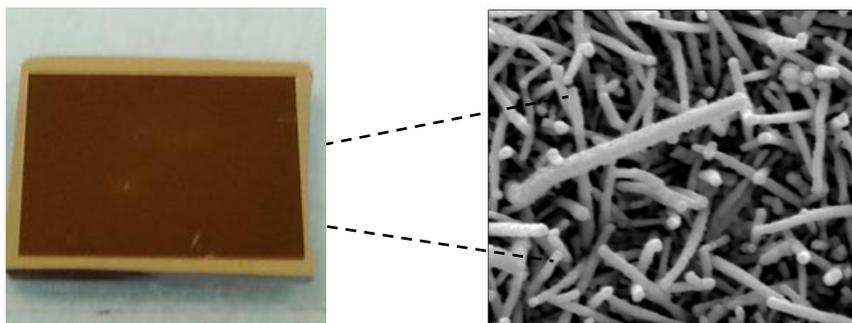


Figura 22 a sinistra: Pannello di nanofili di silicio, a destra: Ingrandimento al microscopio elettronico della morfologia dei nanofili di silicio ottenuti tramite PECVD, (per cortesia della Dott.ssa Annalisa Convertino, CNR-IMM, Roma)

Per poter valutare le caratteristiche di questa tipologia di materiale, la biocompatibilità e la proliferazione cellulare di astrociti corticali di ratto sono stati svolti test di vitalità cellulare di FDA (Figura 23a). Gli astrociti piastrati su substrati di controllo in Poli-D-lisina assumevano la tipica forma caratteristica di astrociti in coltura, ovvero una forma poligonale piatta, mentre gli astrociti piastrati e cresciuti su substrati di Au/SiNWs mostrano un differenziamento morfologico delle cellule, le quali assumono una morfologia molto simile a quella degli astrociti *in vivo*, presentando lunghi processi che si intersecano tra loro con pedicelli avvolti sui nanofili di oro.

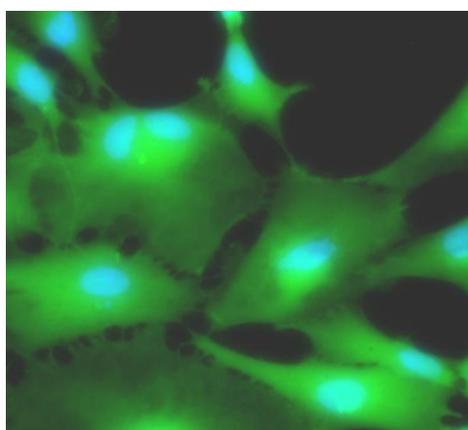


Figura 23a Immagine al microscopio confocale 20X di astrociti piastrati su PDL sui quali è stato svolto il test del FDA

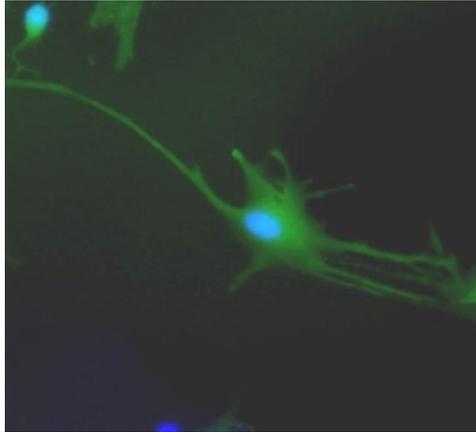


Figura 23b Immagine al microscopio confocale 20X di astrociti piastrati su SiNWs sui quali è stato svolto il test del FDA

Il numero di cellule per mm^2 su Au/SiNWs addizionati di PDL e il substrato nanostrutturato di Au/SiNWs privato di PDL non è significativo.

Questo dimostra che il substrato di controllo che è stato additivato al nostro biomateriale di studio non è essenziale per poter ottenere un ottimo substrato per lo studio e differenziamento degli astrociti *in vitro*.

Inoltre, nel laboratorio in cui ho svolto il mio periodo di tesi sperimentale, sono in atto studi di quantificazione della proteina fibrillare acida (GFAP), secondo cui questa proteina non risulterebbe essere sovra-espressa, quindi non dimostrando la presenza di una reazione gliotica (i dati non vengono riportati).

Per valutare l'interazione cellula/substrato è stata svolta un'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM), le cui immagini sono state riportate in Figura 24a-b. Da queste si evince che i lunghi processi astrocitari che dipartono dal corpo cellulare hanno un intimo contatto con i Au/SiNWs. Questi dati risultano essere molto incoraggianti in quanto questa tipologia di interfaccia è stata viene utilizzata come base per la fabbricazione di un dispositivo per la registrazione extracellulare di astrociti, e sono attualmente in atto degli esperimenti volti a dimostrare la registrazione dell'attività ionica di astrociti piastrati su elettrodi di Au/SiNWs.

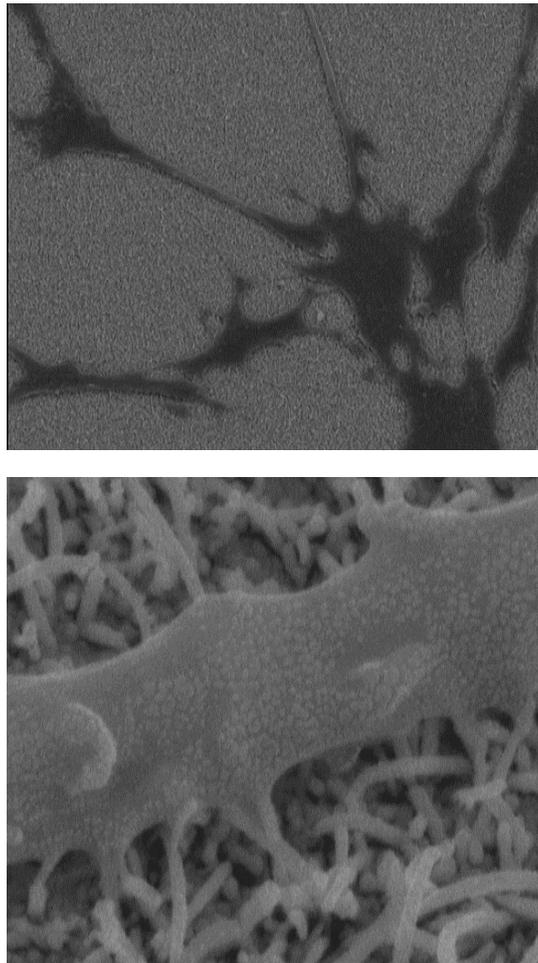


Figura 24a,b Immagini al microscopio elettronico a scansione di astrociti piastrati su substrati di Au/SiNWs

4.5 INTERAZIONE DI GRAFENE BIOMIMETICO CON CELLULE NEURALI

L'ossido di grafene (GO) Grazie alla sua forma tipicamente bi-dimensionale, flessibilità, resistenza meccanica e più di tutti alla chimica regolabile della sua superficie in fogli rappresenta una delle migliori soluzioni per creare interfacce organiche che interagiscono con le membrane cellulari.

Per migliorare la capacità di adesione del biomateriale, con la membrana cellulare di astrociti di colture primarie di ratto, la superficie del GO è stata additivata con fosfolipidi (PL), creando così un nuovo composto biomimeticico di GO-PL. L'innesto covalente di PL su nanofogli di GO è stato realizzato

tramite la tecnica ATRP (Atom-Transfer Radical-Polymerization) tra l'acriloloile PL e i nanofogli di GO modificati tramite un iniziatore di bromuro.

Per studiare la biocompatibilità di questo composto sono state piastrate su di esso delle cellule astrocitarie di colture primarie di ratto.

Per gli esperimenti svolti di vitalità cellulare della Fluoresceina Diacetato (FDA) e dell'Alamar Blue, sono stati utilizzati un substrato di controllo in Poli-D-Lisina (PDL), un substrato non funzionalizzato in GO e uno in GO ridotto (rGO).

Anche per l'analisi dell'immunofluorescenza sono stati utilizzati i medesimi substrati di controllo.

Come da protocollo, sono stati piastrati gli astrociti su tutti i substrati.

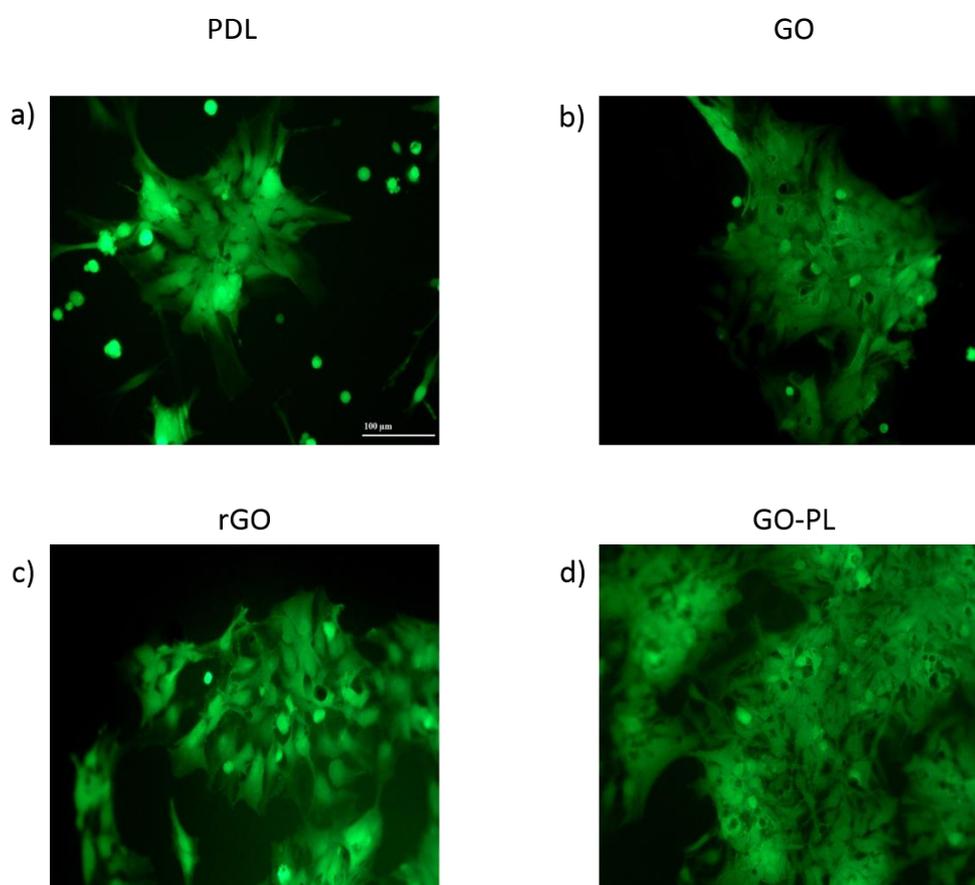


Figura 25a-d Immagini al microscopio confocale di astrociti piastrati su PDL, GO, rGO e GO-PL sui quali è stato svolto il test del FDA tratto da Durso et al., *Journal Chemistry B*, 2018.

Il test del FDA è stato svolto dopo 2 giorni in vitro (*days in vitro*, div), i risultati di questo test sono riportati in figura 25a-d. Come è possibile notare, il numero di cellule in condizioni vitali risulta essere superiore sul substrato di GO-PL rispetto che sugli altri materiali.

Per poter ricavare un'analisi quantitativa della vitalità cellulare, è stato applicato il test dell'Alamar Blue dopo 1, 2, 4, e 7 div. Tramite il rapporto F/F_0 (fluorescenza emessa da campione/fluorescenza emessa dal controllo negativo) per area, si è riusciti a stimare il numero di cellule in condizioni vitali per campione (Posati et al., 2016), essendo le due quantità direttamente proporzionali tra loro. Il numero di astrociti che ha aderito a GO e rGO è paragonabile a quello aderito al substrato di controllo di PDL, mentre l'adesione degli astrociti a GO-PL è stata più del doppio rispetto agli altri substrati per 1 div, mentre si è registrato un decremento per le altre misure, che comunque sono risultate essere decisamente più elevate rispetto ai substrati di controllo.

L'alto numero di cellule osservate sul substrato di GO-PL non è dovuto ad una risposta gliotica o ipertrofica. Infatti, il tasso di proliferazione è paragonabile tra tutti i campioni osservati. L'alto numero di cellule osservate su GO-PL a 1 div e 2 div può essere spiegato grazie all'alta adesione degli astrociti su questo substrato. Inoltre, l'area disponibile all'adesione cellulare è la stessa per tutti i campioni. Quindi, la confluenza (ovvero l'occupazione di tutto lo spazio disponibile) e l'inibizione da contatto della proliferazione avviene prima in cellule cresciute su GO-PL rispetto a quelle cresciute sui substrati di controllo, causando, per le altre misure a div successivi, una minor proliferazione in percentuale delle cellule sul substrato d'analisi.

Il minor numero di cellule aderite sul substrato di rGO paragonato al GO-PL indica che l'adesione cellulare non dipende dalla rugosità o dalla idrofobicità della materiale in quanto entrambi presentano valori simili riguardo queste proprietà.

Infine, per poter analizzare se su questi substrati potesse esserci una reazione gliotica degli astrociti, è stato svolto il test di immunofluorescenza valutando l'espressione proteina fibrillare acida (GFAP). Dopo aver applicato il protocollo per questo esame, è stata applicata un'analisi al microscopio confocale, permettendo di ricavare le immagini in Figura 25a-d.

Dalle immagini e dall'analisi quantitativa dei segnali fluorescenti è stato possibile confermare che i livelli di GFAP espressi sono simili per cellule cresciute sui differenti substrati, suggerendo che ognuno di essi non promuove una reazione gliotica in vitro.

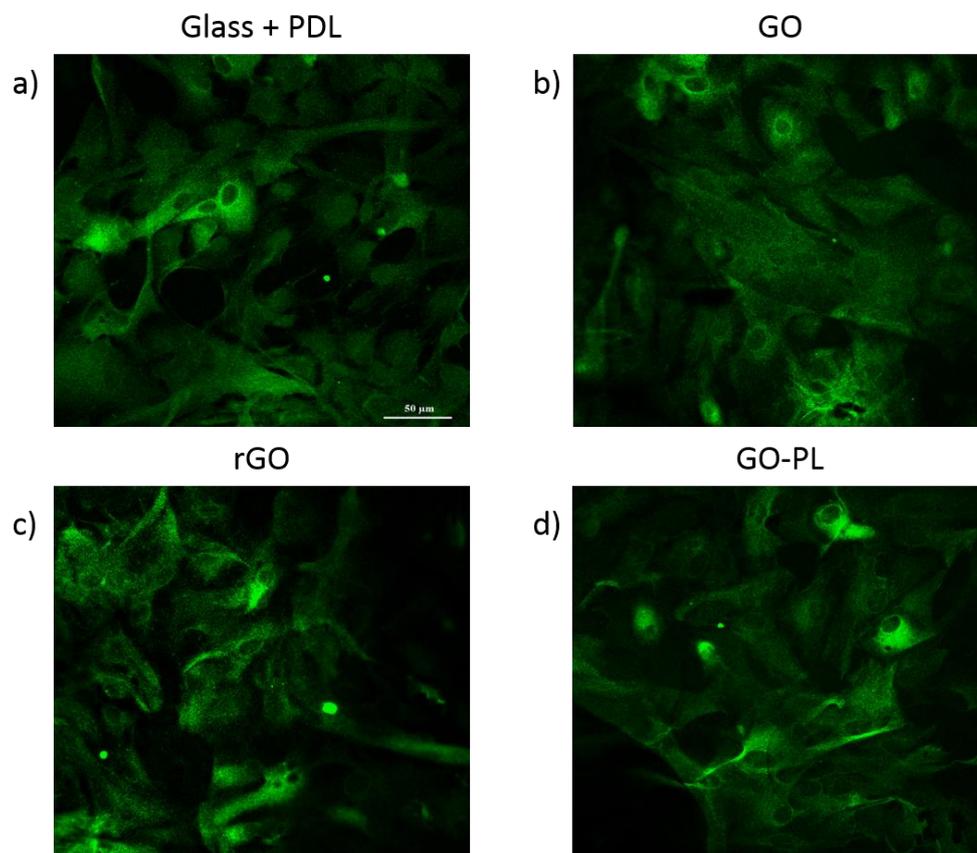


Figura 26a-d Espressione della GFAP in astrociti piastrati sui substrati analizzati tratto da Durso et al., *Journal Chemistry B*, 2018.

5 CONCLUSIONI

Le idrotalciti promuovono il differenziamento molecolare e funzionale degli astrociti *in vitro* coinvolgendo il riarrangiamento del citoscheletro. Questo modello può risultare essere importante nella promozione della ricerca e dello studio di eventi molecolari e dinamiche funzionali astrogliali che possiedono una rilevanza clinica nei disordini cerebrale.

Anche materiali nano strutturati come Au/SiNWs, inducono il differenziamento di astrociti di colture di ratto, dall'intimo contatto, registrato grazie all'analisi con il microscopio elettronico a scansione, tra substrato e cellule, è possibile utilizzare questo materiale come interfaccia per la costruzione di un dispositivo per la registrazione elettrofisiologica di cellule non eccitabili, dato mai riportato in letteratura, e per questo completamente innovativo nell'ambito della ricerca e dello sviluppo di tecnologie che permettano lo studio degli astrociti, stimolando ricerche in modo tale da riuscire a prevenire e curare neuropatologie che si possono instaurare.

Tuttavia, nel laboratorio dove ho svolto la tesi ci siamo soffermati anche su biomateriali organici come l'ossido di grafene (GO) additivato di un fosfolipide (GO-PL) anche in questo caso la biocompatibilità e crescita cellulare è stata verificata. In ogni caso, film nanostrutturati in GO-PL, possono essere dunque considerati dei rivestimenti versatili e regolabili per creare un'interfaccia con cellule gliali senza indurre reazione gliotica, permettendo dunque in futuro di riuscire a sviluppare una tecnologia che permetta lo studio più approfondito degli astrociti e del loro ruolo nella eziologia di neuro fisiopatologie, nondimeno questi studi sono pioneristici per lo sviluppo di dispositivi che abbiano come bersaglio la funzione/disfunzione degli astrociti per la cura di patologie cerebrali.

6 RINGRAZIAMENTI

Ringrazio per il contributo e l'appoggio datomi in questo lavoro di tesi sperimentale: il Dott. Marco Caprini, Alessia Minardi del Laboratorio di Fisiologia Cellulare del Dip. FABIT dell'Università di Bologna per avermi concesso di assistere alla preparazione di colture cellulari. Annalisa Convertino, Luca Maiolo, Davide Polese, Marco Caprini, Francesco Valle, per l'aiuto relativo alla ricerca e all'analisi dei substrati in Au/SiNWs; Manuela Melucci e Vincenzo Palermo per il lavoro svolto sui biomateriali in ossido di grafene e Tamara Posati, Grazia Paola Nicchia e Mariagrazia Mola per il lavoro descritto sulle idrotalciti. Inoltre ringrazio Roberto Zamboni direttore dell'istituto ISOF CNR per avermi dato la possibilità di frequentare l'istituto per svolgere il mio lavoro di tesi.

In particolare vorrei soffermarmi a ringraziare Emanuela Saracino e Ana Isabel Borrachero Conejo, per avermi guidato e aiutato come nessun altro ogni giorno della mia esperienza di tesi sperimentale presso il CNR di Bologna, Francesco Formaggio, per il grande aiuto nell'analisi Wester Blot, Marianna Barbalinardo, per il supporto datomi per la microscopia confocale e SEM, e soprattutto la professoressa Valentina Benfenati, per avermi dato la possibilità di lavorare presso il suo gruppo di ricerca mostrandomi un ambito della settore della ricerca completamente innovativo.

Inoltre, ci terrei a ringraziare in particolar modo: la mia famiglia Alberto, mio papà, Roberta, mia mamma, e Anna, mia sorella, per avermi sempre sostenuto in questi anni, soprattutto nei momenti più difficili, e i miei parenti, in particolare: i nonni Luigino e Amelia, gli zii Massimo, Rita, Davide e Cristina, i miei cugini Arianna, Daniele, Carolina, Eleonora e Angela Paola; i miei amici, soprattutto Nazzareno Italiano, Enrico Zannarini, Luca Cespuglio, e Alberto Moro per tutti i momenti di immensa gioia che sono riusciti a trasmettermi e per tutti i consigli che hanno saputo darmi; il gruppo degli "Amici della GP2", in particolare Carlo Cominato per le numerose settimane passate insieme, Thomas Papparella, Giulia Paiato, Federico Oliva, Sarah Libanore e Daniele Pavarin per la grandissima esperienza di guida che abbiamo ricoperto insieme per giovani e adolescenti delle scuole superiori di Rovigo, i

ragazzi che sono passati per la “Casa GP2”, perché, come sempre, mi hanno permesso di raccogliere molto di più di quanto io abbia seminato; i sacerdoti Don Daniele Spadon, Don Michele Samiolo e Don Enrico Schibuola per tutto il tempo che investono in me permettendomi un percorso di crescita personale; i miei colleghi, che inevitabilmente sono diventati miei grandi amici, in particolare Anna Astolfi, Matteo Occhini, Enrico Perugini, Elena Magnani, Giacomo Luppi, Mattia Sarti e Nicola Del Bene; i miei vecchi coinquilini Andrea Ferroni, per tutte le giornate vissute insieme con gioia e talvolta sconforto, che ci hanno permesso di conoscerci e diventare amici inseparabili nonostante la distanza, e Gabriele Bordino.

7 BIBLIOGRAFIA

- Agulhon, C., Petravicz, J., McMullen, A. B., Sweger, E. J., Minton, S. K., Taves, S. R., ... McCarthy, K. D. (2008). What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? *Neuron*, 59(6), 932–946. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.004>
- Andriezen, W. L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *British Medical Journal*, 2(1700), 227–230. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20754383%5Chhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2422013>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1998). Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons, *10*(February), 2129–2142.
- Baker, D. A., Mcfarland, K., Lake, R. W., Shen, H., Tang, X., Toda, S., & Kalivas, P. W. (2003). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse, *6*(7), 743–749.
- Benfenati, V., & Amiry-moghaddam, M. (2007). EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID-RELATED CHANNEL 4 (TRPV4) IN RAT CORTICAL ASTROCYTES, *148*, 876–892. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.039>
- Benfenati, V., Caprini, M., Dovizio, M., Mylonakou, M. N., Ferroni, S., & Ottersen, O. P. (2011). An aquaporin-4 / transient receptor potential vanilloid control in astrocytes, *108*(6), 2563–2568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012867108>
- Benfenati, V., Caprini, M., Nobile, M., Rapisarda, C., & Ferroni, S. (2006). Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 98(2), 430–445. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03877.x>
- Bennett, M. R., Farnell, L., & Gibson, W. G. (2005). A quantitative model of purinergic junctional transmission of calcium waves in astrocyte networks. *Biophysical Journal*, 89(4), 2235–2250. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.062968>
- Bergles, D. E., & Jahr, C. E. (1997). Synaptic Activation of Glutamate Transporters in Hippocampal Astrocytes, *19*, 1297–1308.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., & Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate, *7*(6), 613–620. <https://doi.org/10.1038/nn1246>
- Bezzi, P., Vesce, S., Rossi, D., Rizzini, B. L., & Volterra, A. (1998). Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes, *391*(January), 281–285.
- Bittar, P. G., Martin, J., & Magistretti, P. J. (1998). Evidence Supporting the Existence of an Activity-Dependent Astrocyte-Neuron Lactate Shuttle, 291–299.
- Bolognesi, M., Tessarolo, M., Posati, T., Nocchetti, M., Benfenati, V., Seri, M., ... Muccini, M. (2013). Efficiency enhancement of P3HT:PCBM solar cells containing scattering Zn-Al hydrotalcite nanoparticles in the PEDOT:PSS layer. *Organic Photonics and Photovoltaics*, 1, 1–10. <https://doi.org/10.2478/oph-2013-0001>
- Bootman, M. D., Rietdorf, K., Collins, T., Walker, S., & Sanderson, M. (2014). Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging, 25–50. <https://doi.org/10.1101/pdb.top066050>
- Bowser, D. N., & Khakh, B. S. (2007). Vesicular ATP Is the Predominant Cause of Intercellular Calcium Waves in Astrocytes. *The Journal of General Physiology*, 129(6), 485–491. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709780>
- Bradley, D. P., Smith, J. M., Smith, M. I., Bockhorst, K. H., Papadakis, N. G., Hall, L. D., ... Huang, C. L. (2002). Cortical spreading depression in the feline brain following sustained and transient stimuli studied using diffusion-weighted imaging, 39–56. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.025353>
- Calcraft, P. J., Ruas, M., Pan, Z., Cheng, X., Arredouani, A., Hao, X., ... Zhu, M. X. (2009). LETTERS NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246), 596–600. <https://doi.org/10.1038/nature08030>
- Cameron, R. S., & Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*, 4(2), 124–137.

<https://doi.org/10.1002/glia.440040204>

- Charles, A. (1998). Intercellular Calcium Waves in Glia, *49*(September 1997), 39–49.
- Chen, Y., Willcockson, H. H., & Valtschanoff, J. G. (2009). Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Experimental Neurology*, *220*(2), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.030>
- Coles, J. A., Orkand, R. K., & Yamate, C. L. (1989). Chloride Enters Glial Cells and Photoreceptors in Response to Light Stimulation in the Retina of the Honey Bee Drone, *297*, 287–297.
- Cornell-bell, A. N. N. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1988). showing the initial response to, *247*(24), 2–5.
- Covelo, A., & Araque, A. (2015). LATERAL REGULATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION BY ASTROCYTES. *NEUROSCIENCE*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.036>
- Doly, S., Fischer, J., Salio, C., & Conrath, M. (2004). The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes, *357*, 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.12.051>
- Dossi, E., Vasile, F., & Rouach, N. (2018). Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Research Bulletin*, *136*, 139–156. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.02.001>
- Egawa, K., Yamada, J., Furukawa, T., Yanagawa, Y., & Fukuda, A. (2013). Cl⁻ homeodynamics in gap junction-coupled astrocytic networks on activation of GABAergic synapses, *16*, 3901–3917. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.257162>
- Eversmann, B., Jenkner, M., Hofmann, F., Paulus, C., Brederlow, R., Holzapfl, B., ... Thewes, R. (2003). A 128 x 128 CMOS Biosensor Array for Extracellular Recording of Neural Activity. *Ieee Journal of Solid-State Circuits*, *38*(12), 2306–2317.
- Feustel, P. J., Jin, Y., & Kimelberg, H. K. (2004). Volume-Regulated Anion Channels Are the Predominant Contributors to Release of Excitatory Amino Acids in the Ischemic Cortical Penumbra, *1164*–*1169*. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000124127.57946.a1>
- Fleischer, W., Theiss, S., Slotta, J., Holland, C., & Schnitzler, A. (2015). High-frequency voltage oscillations in cultured astrocytes. *Physiological Reports*, *3*(5), 1–20. <https://doi.org/10.14814/phy2.12400>
- Golgi, C. (1873). Sulla sostanza grigia del cervello. *Gazz. Med. Ital. Lombardia*, *6*, 244–246.
- Gray, P. T. A., & Ritchie, J. M. (1986). A Voltage-Gated Chloride Conductance in Rat Cultured Astrocytes, *267*–*288*. <https://doi.org/10.1098/rspb.1986.0055>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Pflügers Archiv Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches, *85*–*100*.
- Hassinger, T. D., Guthrie, P. B., Atkinson, P. B., Bennett, M. V., & Kater, S. B. (1996). An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(23), 13268–13273. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.13268>
- Hertz, L., & Chen, Y. (2016). Importance of Astrocytes for Potassium Ion (K⁺) homeostasis in Brain and glial Effects of K⁺ and its Transporters on Learning. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.018>
- Hinkle, M. (1971). The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers of the crayfish, *4*.
- Hiyama, T. Y., Yoshida, M., Matsumoto, M., Suzuki, R., Matsuda, T., & Watanabe, E. (2013). Article Endothelin-3 Expression in the Subfornical Organ Enhances the Sensitivity of Na^x, the Brain Sodium-Level Sensor, to Suppress Salt Intake. *Cell Metabolism*, *17*(4), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.018>
- Ho, K. W., Lambert, W. S., & Calkins, D. J. (2014). Activation of the TRPV1 Cation Channel Contributes to Stress-Induced Astrocyte Migration. <https://doi.org/10.1002/glia.22691>
- Holthoff, K., & Witte, O. W. (2000). Redistribution in Rat Neocortex, *292*(December 1998), 288–292.
- Hsu, M. S., Seldin, M., Lee, D. J., & Seifert, G. (2011). LAMINAR-SPECIFIC AND DEVELOPMENTAL EXPRESSION OF AQUAPORIN-4 IN THE MOUSE HIPPOCAMPUS. *NSC*, *178*, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.020>
- Kanemaru, K., Kubota, J., Sekiya, H., Hirose, K., Okubo, Y., & Iino, M. (2013). Calcium-dependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(28), 11612–11617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300378110>
- Kettenmann, H., Backus, K. H., & Schachner, M. (1987). 7'-Aminobutyric acid opens Cl⁻ channels in cultured astrocytes, *404*.

- Kimelberg, H. K., Macvicar, B. A., & Sontheimer, H. (2006). Anion Channels in Astrocytes : Biophysics , Pharmacology , and Function, *757*(September), 747–757. <https://doi.org/10.1002/glia>
- Kimelberg, H. K., Pang, S., & Higman, S. (1990). Swelling-Induced Release Astrocyte Cultures and Taurine from, (May).
- King, L. S., Kozono, D., & Agre, P. (2004). REVIEWS FROM STRUCTURE TO DISEASE : THE EVOLVING TALE OF, *5*(September). <https://doi.org/10.1038/nrm1469>
- Kirischuk, S., Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2012). Sodium dynamics : another key to astroglial excitability ? *Trends in Neurosciences*, *35*(8), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.04.003>
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system, *129*, 1045–1056. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.008>
- Lalo, U., Palygin, O., Verkhratsky, A., Grant, S. G. N., & Pankratov, Y. (2016). ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex. *Nature Publishing Group*, (May), 1–20. <https://doi.org/10.1038/srep33609>
- Larsen, B. R., Assentoft, M., Cotrina, M. L., Hua, S. Z., Nedergaard, M., Kaila, K., ... Macaulay, N. (2014). Contributions of the Na⁺ / K⁺ -ATPase , Clearance and Volume Responses. <https://doi.org/10.1002/glia.22629>
- Lascola, C. D., & Kraig, R. P. (1996). Whole-Cell Chloride Currents Changes in Cell Morphology in Rat Astrocytes Accompany, *16*(8), 2532–2545.
- Lee, H. A. E. U. N. G., Yamazaki, Y., Tanaka, K. F., Furuya, K., Sokabe, M., Hida, H., ... Ikenaka, K. (2012). Increased Astrocytic ATP Release Results in Enhanced Excitability of the Hippocampus, *000*, 1–15. <https://doi.org/10.1002/glia.22427>
- Leybaert, L., & Sanderson, M. J. (2012). AND FUNCTION, 1359–1392. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2011>
- Li, D., Agulhon, C., Schmidt, E., Oheim, M., & Ropert, N. (2013). New tools for investigating astrocyte-to-neuron communication, *7*(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00193>
- Liu, Q., Xu, Q., Arcuino, G., Kang, J., & Nedergaard, M. (2004). Astrocyte-mediated activation of neuronal kainate receptors, *101*(9), 2–7.
- Macaulay, N., Gether, U., Klærke, D. A., & Zeuthen, T. (2001). Water transport by the human Na⁺ -coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes.
- Mack, A. F., Wolburg, H., Noell, S., Fallier-becker, P., Beyer, C., & Kro, S. (2007). Effects of agrin on the expression and distribution of the water channel protein aquaporin-4 and volume regulation in cultured astrocytes, *26*, 2109–2118. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05850.x>
- Malarkey, E. B., Ni, Y., & Parpura, V. (2008). Ca²⁺ entry through TRPC1 channels contributes to intracellular Ca²⁺ dynamics and consequent glutamate release from rat astrocytes. *Glia*, *56*(8), 821–835. <https://doi.org/10.1002/glia.20656>
- McCarthy, K. D., & Partlow, L. M. (1976). Preparation of pure neuronal and non-neuronal cultures from embryonic chick sympathetic ganglia: A new method based on both differential cell adhesiveness and the formation of homotypic neuronal aggregates. *Brain Research*, *114*(3), 391–414. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(76\)90962-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(76)90962-8)
- Mccarthy, K. E. N. D. (1980). PREPARATION OF SEPARATE ASTROGLIAL AND OLIGODENDROGLIAL CELL CULTURES FROM RAT CEREBRAL TISSUE A novel method has been developed for the preparation of nearly pure separate cultures of astrocytes and oligodendrocytes . The method is based on (a) the abs, *85*(June).
- Miller, R. H., & Raff, M. C. (1984). Fibrous and Protoplasmic Astrocytes Are Biochemically and Developmentally Distinct'. *The Journal of Neuroscience*, *4*(2), 585–592.
- Miller, R. L., Wang, M. H., Gray, P. A., Salkoff, L. B., Loewy, A. D., RI, M., ... Ad, L. (2013). ENaC-expressing neurons in the sensory circumventricular organs become c-Fos activated following systemic sodium changes, (10), 1141–1153. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00242.2013>
- Min, R., & Nevian, T. (2012). Astrocyte signaling controls spike timing – dependent depression at neocortical synapses, *15*(5). <https://doi.org/10.1038/nn.3075>
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., ... Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1, 599–605.

- Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P. (2013). PHYSIOLOGICAL ROLES OF AQUAPORIN-4 REGULATION WATER AND WASTE CLEARANCE SENSORY SYSTEMS, (40), 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
- Nedergaard, M. (n.d.). Direct Signaling.
- Nedergaard, M., & Verkhratsky, A. (2012). Artifact Versus Reality How Astrocytes Contribute to Synaptic Events?, *000*(December 2011), 1–11. <https://doi.org/10.1002/glia.22288>
- Neely, J. D., Amiry-moghaddam, M., Ottersen, O. P., Froehner, S. C., Agre, P., & Adams, M. E. (2001). Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein.
- Neusch, C., Rozengurt, N., Jacobs, R. E., Lester, H. A., & Kofuji, P. (2001). Kir4 . 1 Potassium Channel Subunit Is Crucial for Oligodendrocyte Development and In Vivo Myelination, *21*(15), 5429–5438.
- Nicchia, G. P., Rossi, A., Mola, M. G., Procino, G., Frigeri, A., & Svelto, M. (2008). Actin cytoskeleton remodeling governs aquaporin-4 localization in astrocytes. *Glia*, *56*(16), 1755–1766. <https://doi.org/10.1002/glia.20724>
- Nielsen, S., Rash, J. E., Yasumura, T., Hudson, S. C., & Agre, P. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord, *95*(September), 11981–11986.
- Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I. L. S., & Agre, P. (1993). Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia, *90*(August), 7275–7279.
- Nilius, B. (2012). Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Brain : the Good and the Ugly, *20*(3), 343–355. <https://doi.org/10.1017/S1062798711000597>
- Nilius, B., & Appendino, G. (1938). Spices : The Savory and Beneficial Science of Pungency. <https://doi.org/10.1007/112>
- Nilius, B., Appendino, G., & Owsianik, G. (2012). The transient receptor potential channel TRPA1: From gene to pathophysiology. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *464*(5), 425–458. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1158-z>
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels.
- Nwaobi, S. E., Cuddapah, V. A., Patterson, K. C., Randolph, A. C., & Olsen, M. L. (2016). The role of glial - specific Kir4 . 1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1553-1>
- Oberheim Bush, N. A., & Nedergaard, M. (2017). Do Evolutionary Changes in Astrocytes Contribute to the Computational Power of the Hominid Brain? *Neurochemical Research*, *42*(9), 2577–2587. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2363-0>
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H. C., Wang, F., ... Goldman, S. A. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes, *29*(10), 3276–3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain, *29*(10). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.08.004>
- Obien, M. E. J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D. J., & Frey, U. (2015). Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Frontiers in Neuroscience*, *9*(JAN), 423. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00423>
- Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: From synapse to behavior. *Trends in Neurosciences*, *36*(7), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>
- Papadopoulos, M. C. (2005). Aquaporin-4 Gene Disruption in Mice Reduces Brain Swelling and Mortality in Pneumococcal Meningitis *, *280*(14), 13906–13912. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413627200>
- Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system, *14*(April). <https://doi.org/10.1038/nrn3468>
- Pappalardo, L. W., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2016). Sodium Channels in Astroglia and Microglia, 1–18. <https://doi.org/10.1002/glia.22967>
- Parpura, V., & Fang, L. (n.d.). © 19 9 4 Nature Publishing Group.
- Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2012). The astrocyte excitability brief: From receptors to gliotransmission. *Neurochemistry International*, *61*(4), 610–621. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.001>
- Parri, H. R., Gould, T. M., & Crunelli, V. (2001). Spontaneous astrocytic Ca²⁺ + oscillations in situ drive NMDAR- mediated neuronal excitation.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses : astrocytes process and control synaptic information, (July).

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>

- Pizzo, P., Burgo, A., Pozzan, T., & Fasolato, C. (2001). Role of capacitative calcium entry on glutamate-induced calcium influx in type-I rat cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *79*(1), 98–109. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00539.x>
- Posati, T., Bellezza, F., Tarpani, L., Perni, S., Latterini, L., Marsili, V., & Cipiciani, A. (2012). Selective internalization of ZnAl-HTlc nanoparticles in normal and tumor cells. A study of their potential use in cellular delivery. *Applied Clay Science*, *55*, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.10.006>
- Posati, T., Benfenati, V., Sagnella, A., Pistone, A., Nocchetti, M., Donnadio, A., ... Muccini, M. (2014). Innovative multifunctional silk fibroin and hydroxalcite nanocomposites: A synergic effect of the components. *Biomacromolecules*, *15*(1), 158–168. <https://doi.org/10.1021/bm401433b>
- Qiu, Z., Dubin, A. E., Mathur, J., Tu, B., Reddy, K., & Miraglia, L. J. (2014). SWELL1, a Plasma Membrane Protein, Is an Essential Component of Volume-Regulated Anion Channel, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.024>
- Qusos, A., Geewan, C. S. V., Grenwell, P., & Kerrigan, M. J. P. (2011). siRNA-Mediated Inhibition of Na⁺ + K⁺ - 2Cl⁻ Cotransporter (NKCC1) and Regulatory Volume Increase in the Chondrocyte, *I*, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9389-z>
- Ransom, C. B., Ransom, B. R., & Sontheimer, H. (2000). Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps.
- Rao, S. D., & Weiss, J. H. (2004). Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, *27*(1), 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.11.001>
- Rice, M. E., & Nicholson, C. (1990). GLUTAMATE- AND ASPARTATE-INDUCED EXTRACELLULAR POTASSIUM AND CALCIUM SHIFTS AND THEIR RELATION TO THOSE OF KAINATE, QUISQUALATE AND N-METHYL-D-ASPARTATE IN THE ISOLATED TURTLE CEREBELLUM, *38*(2), 295–310.
- Rivers, V. (2003). Double Hydroxides: Present and Future. *Science Publishers Inc., New York, 2001*.
- Rocha, P. R. F., Medeiros, M. C. R., Kintzel, U., Vogt, J., Araújo, I. M., Mestre, A. L. G., ... Gomes, H. L. (2016). Extracellular electrical recording of pH-triggered bursts in C6 glioma cell populations. *Science Advances*, *2*(12), 1–9. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600516>
- Sahlender, D. A., Savtchouk, I., & Volterra, A. (2014). What do we know about gliotransmitter release from astrocytes?
- Salatino, J. W., Ludwig, K. A., Kozai, T. D. Y., & Purcell, E. K. (2017). in the Brain. *Nature Biomedical Engineering*, *1*(November). <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0154-1>
- Serrano, A., Haddjeri, N., Lacaillle, J., Robitaille, R., & Centre-ville, S. (2006). GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression, *26*(20), 5370–5382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5255-05.2006>
- Shigetomi, E., Tong, X., Kwan, K. Y., Corey, D. P., & Khakh, B. S. (2012). TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nature Neuroscience*, *15*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1038/nn.3000>
- Smith, R. L., Freund, T. F., & Sik, A. (2000). DISTRIBUTION OF CHLORIDE CHANNEL-2-IMMUNOREACTIVE NEURONAL AND ASTROCYTIC PROCESSES IN THE HIPPOCAMPUS, *101*(1), 51–65.
- Takata, N., Mishima, T., Hisatsune, C., Nagai, T., Ebisui, E., Mikoshiba, K., & Hirase, H. (2011). Astrocyte Calcium Signaling Transforms Cholinergic Modulation to Cortical Plasticity In Vivo. *Journal of Neuroscience*, *31*(49), 18155–18165. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-11.2011>
- Torres, A., Wang, F., Xu, Q., Fujita, T., & Dobrowolski, R. (2012). Extracellular Ca²⁺ Acts as a Mediator of Communication from Neurons to Glia, *5*(January). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002160>
- Verkhratsky, A. (2005). Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons, 201–279. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>
- Verkhratsky, A., Nedergaard, M., B, P. T. R. S., Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2014). Astroglial cradle in the life of the synapse Astroglial cradle in the life of the synapse, (September).
- Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J., & Parpura, V. (2012). Molecular and Cellular Endocrinology Calcium signalling in astroglia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *353*(1–2), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.039>

- Viitanen, T., Ruusuvuori, E., Kaila, K., & Voipio, J. (2010). The K⁺ – Cl⁻ cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus, *9*, 1527–1540. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.181826>
- Voss, F. K. (2014). Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the Volume-Regulated Anion Channel VRAC, *634*. <https://doi.org/10.1126/science.1252826>
- Walz, W., & Hertz, L. (1984). Intense Furosemide-Sensitive Potassium Accumulation in Astrocytes in the Presence of Pathologically High Extracellular Potassium Levels, 301–304.
- Words, K. E. Y. (2003). Expression of Voltage-Gated Ca²⁺ Channel Subtypes in Cultured, *353*(July 2002), 347–353. <https://doi.org/10.1002/glia.10162>
- Zador, Z., Stiver, S., Wang, V., & Manley, G. T. (n.d.). Role of Aquaporin-4 in Cerebral Edema and Stroke, 159–170.
- Zanotti, S., & Charles, A. (1997). Extracellular Calcium Sensing by Glial Cells : Low Extracellular Calcium Induces Intracellular Calcium Release and Intercellular Signaling, 594–602.
- Zorec, R., Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P. G., Verkhratsky, A., & Parpura, V. (2012). Astroglial Excitability and Gliotransmission: An Appraisal of Ca²⁺ as a Signalling Route. *ASN Neuro*, *4*(2), AN20110061. <https://doi.org/10.1042/AN20110061>