

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

---

SCUOLA DI SCIENZE  
Corso di Laurea in Fisica

**PROPRIETÀ ELETTRICHE DI CELLULE  
INTERAGENTI CON MATRICI  
POLIMERICHE BIOCAMPATIBILI**

**Relatore:**  
Chiar.mo Prof.  
GASTONE CASTELLANI

**Presentata da:**  
FABRIZIO AMORINI

**Correlatore:**  
Dott.ssa  
ISABELLA ZIRONI

**II sessione  
2013 - 2014**



## Abstract

L'utilizzo di polimeri organici coniugati in dispositivi elettronici per applicazioni biologiche, grazie alle loro proprietà meccaniche ed elettriche, insieme alla loro biocompatibilità, è un campo di ricerca relativamente nuovo e in rapida espansione.

In questo lavoro di tesi si utilizza la tecnica del Voltage Clamp in configurazione "whole cell" per caratterizzare le proprietà elettrofisiologiche della linea cellulare di glioblastoma multiforme (T98G) e per registrare le correnti ioniche di cellule adese su una matrice polimerica biocompatibile di poli(etilenediossiofene)-poli(stirenesulfonato) (PEDOT:PSS).

La tecnica consiste nel bloccare il potenziale di membrana al valore desiderato, secondo un preciso protocollo di stimolazione, misurando la corrente necessaria per mantenere costante il potenziale presente tra le due superfici della membrana cellulare.

Nella prima parte del lavoro le cellule sono state perfuse con farmaci inibitori dei canali potassio, prima con il bloccante non specifico tetraetilammonio (TEA), e poi selettivamente tramite bloccanti specifici come iberiotossina e dendrotossina. Il 44% circa delle cellule ha evidenziato una significativa corrente residua riconducibile all'attività dei canali ionici voltaggio-dipendenti Kv1.2. Al contrario nelle cellule restanti questi canali non sono espressi.

Successivamente, sempre utilizzando le T98G, si è analizzato come lo stato di ossidoriduzione del polimero coniugato PEDOT:PSS possa influenzare le correnti dei canali ionici di membrana; è emerso che il substrato di PEDOT:PSS ridotto provoca una diminuzione significativa della corrente registrata rispetto al substrato di controllo (petri in polistirene). Questi risultati sono stati confrontati con le curve di proliferazione delle cellule T98G coltivate per 24h, 48h e 72h sui diversi substrati considerati, evidenziando interessanti correlazioni nel caso del substrato PEDOT:PSS ridotto.



# Indice

<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1 Elettrofisiologia cellulare</b>	<b>3</b>
1.1 La membrana cellulare . . . . .	3
1.1.1 La struttura . . . . .	4
1.1.2 I meccanismi di trasporto ionico . . . . .	5
1.2 Le proprietà elettriche delle cellule . . . . .	7
1.2.1 Il potenziale di membrana . . . . .	7
1.2.2 L'equivalente elettrico della membrana cellulare . . . . .	10
1.3 Il modello di Hodgkin e Huxley . . . . .	13
1.4 I canali ionici del potassio . . . . .	16
1.4.1 Blocco farmacologico . . . . .	19
<b>2 La tecnica del Voltage Clamp</b>	<b>21</b>
2.1 Fondamenti della tecnica . . . . .	21
2.2 Registrazione di correnti . . . . .	23
2.2.1 Metodi di misura . . . . .	26
2.2.2 Limiti teorici di risoluzione . . . . .	29
2.3 Descrizione dell'apparato sperimentale . . . . .	31
<b>3 PEDOT:PSS come dispositivo bioelettronico</b>	<b>35</b>
3.1 Generalità sul PEDOT . . . . .	35
3.2 Struttura del PEDOT:PSS . . . . .	37
3.3 Proprietà dei film di PEDOT:PSS . . . . .	39
3.3.1 Resistenza al calore ed esposizione alla luce . . . . .	39
3.3.2 Affinità con l'acqua . . . . .	40
3.3.3 Proprietà meccaniche e morfologia . . . . .	40
3.3.4 Spettro di assorbimento . . . . .	42
3.3.5 Conducibilità elettrica . . . . .	43
3.4 Esempio di applicazione: substrati per colture cellulari . . . . .	45

<b>4</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>47</b>
4.1	Linea cellulare utilizzata: T98G . . . . .	47
4.1.1	Breve descrizione dei gliomi . . . . .	47
4.1.2	Le colture cellulari . . . . .	49
4.2	Registrazioni in voltage clamp . . . . .	51
4.2.1	Fabbricazione e montaggio delle micropipette . . . . .	52
4.3	Preparazione dei campioni . . . . .	55
4.3.1	Soluzioni e bloccanti . . . . .	55
4.3.2	Preparazione dei substrati di PEDOT:PSS . . . . .	56
4.3.3	Test di proliferazione . . . . .	58
<b>5</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>59</b>
5.1	Presentazione dei risultati . . . . .	59
5.1.1	Caratterizzazione delle proprietà elettriche delle T98G . . . . .	61
5.1.2	Registrazioni di correnti di T98G su PEDOT:PSS . . . . .	63
5.1.3	Capacità proliferativa di T98G su PEDOT:PSS . . . . .	64
5.2	Osservazioni e commenti . . . . .	65
	<b>Conclusioni</b>	<b>69</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>71</b>

# Elenco delle figure

1.1	Struttura della membrana plasmatica. . . . .	4
1.2	Trasporto passivo e trasporto attivo. . . . .	5
1.3	Meccanismo di funzionamento della pompa sodio potassio. . . . .	6
1.4	Implicazione della pompa sodio potassio nello sviluppo del potenziale di membrana a riposo. . . . .	8
1.5	Analogia tra strutture biologiche della membrana e componenti elettrici. . . . .	10
1.6	Equivalente elettrico circuitale della membrana plasmatica. . . . .	11
1.7	Potenziale graduato. . . . .	12
1.8	Una delle prime misure di Hodgkin e Huxley del potenziale d'azione. . . . .	13
1.9	Equivalente elettrico del modello. . . . .	14
1.10	Rappresentazione di un generico canale ionico per il potassio. . . . .	16
1.11	Classificazione dei canali ionici per il potassio. . . . .	17
1.12	Correnti potassio registrate in voltage clamp. . . . .	17
1.13	Schema di una subunità $\alpha$ per un generico canale $K_v$ . . . . .	18
2.1	Schema elettrico essenziale su cui é basata la tecnica del voltage clamp. . . . .	22
2.2	Stimoli di diversa ampiezza e attivazione canali voltaggio-dipendenti. . . . .	23
2.3	Esempio di correnti ioniche registrate in funzione del tempo per diversi potenziali di stimolazione in cellule nervose di calamaro. . . . .	24
2.4	Esempio di effetti sulla sull'ampiezza della corrente registrata di trattamenti farmacologici per corrente $Na^+$ e $K^+$ in cellule nervose di calamaro. . . . .	25
2.5	Rappresentazione schematica delle diverse configurazioni di registrazione. . . . .	27
2.6	Limite dell'impulso misurato dovuto al rumore di fondo. . . . .	30
2.7	Apparecchiature per patch clamp. . . . .	32
2.8	Dettaglio di alcune apparecchiature per patch clamp. . . . .	33
2.9	Apparecchiature per preparazione delle micropipette. . . . .	34
2.10	Attrezzature per preparati biologici. . . . .	34
3.1	Struttura chimica del PEDOT. . . . .	36
3.2	Struttura chimica del PEDOT:PSS. . . . .	38

3.3	Perdita di peso di un campione di PEDOT:PSS con rapporto di peso di 1:20 al variare della temperatura. . . . .	39
3.4	Curve sforzo-deformazione ottenute in diverse condizioni di umidità. . .	41
3.5	Curve di trasmissione della luce nel range UV-Vis per PEDOT:PSS disidratato. . . . .	42
3.6	Spettro di assorbimento del PEDOT:PSS depositato su un elettrodo di una cella elettrochimica al variare della tensione applicata. . . . .	43
3.7	Schema del dispositivo utilizzato per ottenere potenziali di ossido-riduzione lineari. . . . .	46
3.8	Proliferazione e migrazione cellulare. . . . .	46
4.1	Curva di crescita delle T98G riportata nel sito web dell'ECACC. . . . .	49
4.2	Protocollo di stimolazione e relative correnti ioniche indotte. . . . .	51
4.3	Alcuni dettagli riguardanti la preparazione delle micropipette. . . . .	52
4.4	Alcuni dettagli del processo di fabbricazione delle micropipette. . . . .	53
4.5	Sezione del supporto meccanico della micropipetta. . . . .	54
4.6	Preparazione dei substrati di PEDOT:PSS. . . . .	57
4.7	Petri contenenti due campioni di PEDOT:PSS elettrodepositato (ED8). .	57
4.8	Procedura per test di proliferazione su PEDOT:PSS. . . . .	58
5.1	Esempio di tracce con perfusione di TEA. . . . .	61
5.2	Curve I-V con perfusione di TEA. . . . .	61
5.3	Esempio di tracce con perfusione di IbTx e DTx. . . . .	62
5.4	Curve I-V con perfusione di IbTx e DTx. . . . .	62
5.5	Curve I-V su PEDOT:PSS. . . . .	63
5.6	Esempio di grafico dei residui. . . . .	63
5.7	Istogramma proliferazione T98G. . . . .	64
5.8	Istogramma normalizzato proliferazione T98G. . . . .	64

# Introduzione

L'interesse da parte della scienza per lo studio e la comprensione dei fenomeni elettrici a livello cellulare é relativamente recente. Solamente intorno alla metà del Novecento due scienziati dell'università di Cambridge, Alan Hodgkin e Andrew Huxley, iniziarono a realizzare esperimenti sulle proprietà elettriche delle cellule sfruttando le dimensioni del neurone gigante del calamaro, il cui assone, con un diametro di circa 1 mm, permetteva di ottenere le misure necessarie con le tecniche disponibili a quel tempo. Hodgkin e Huxley utilizzarono dei piccoli elettrodi per misurare il potenziale lungo la membrana dell'assone e per far passare attraverso di esso la corrente necessaria per modificarne il potenziale di riposo [1]. Grazie ai risultati ottenuti furono in grado di sviluppare un modello interpretativo dei processi fisiologici del tessuto nervoso molto tempo prima della scoperta dei canali ionici di membrana e per il quale nel 1963 furono insigniti del premio Nobel.

Un altro contributo fondamentale venne alla fine degli anni settanta quando due scienziati tedeschi, Bert Sakmann ed Erwin Neher, svilupparono la tecnica che va sotto il nome di *Patch Clamp* con la quale é possibile ottenere registrazioni di correnti ioniche anche per cellule di dimensione minore [2]. Il punto chiave di questo metodo consiste nel riuscire ad ottenere un alto isolamento elettrico in una piccola area della membrana cellulare, da cui il termine "*patch*", che deve essere dell'ordine di 1 G $\Omega$ , il cosiddetto *Giga-seal*; questa circostanza si ottiene tramite un elettrodo di vetro che viene fatto aderire perfettamente sulla superficie cellulare per mezzo di una leggera depressione applicata attraverso la pipetta stessa; in questa particolare condizione il rumore dovuto alla corrente di dispersione causata dal flusso casuale di ioni tra la superficie cellulare e la superficie della punta della pipetta si mantiene al di sotto dei 10pA e non pregiudica la misura della corrente che fluisce attraverso i canali ionici di membrana.

Piú recentemente la ricerca si é orientata nello studio di applicazioni basate sulla realizzazione di biosensori microelettronici in grado sia di automatizzare il processo di registrazione della risposta cellulare, sia di misurarne in modo non invasivo l'attività, così da permettere il monitoraggio per periodi di tempo piú lunghi evitando che venga compromessa l'integritá elettrofisiologica della cellula stessa. Seguendo questa linea di ricerca sono stati registrati segnali provenienti da neuroni o altre cellule elettricamente attive usando dispositivi basati su semiconduttori inorganici, come elettrodi metallizzati

su substrati di silicio, oppure transistor a effetto di campo (FET) [3]; tali dispositivi sono stati utilizzati anche per simulare elettricamente un neurone.

Attualmente l'interesse nei dispositivi elettronici per applicazioni biologiche si è spostato verso i materiali organici che offrono un campo di ricerca nuovo e in rapida espansione, in particolare i polimeri coniugati possono essere usati in maniera più efficace rispetto ai semiconduttori inorganici "tradizionali", grazie alle loro proprietà meccaniche ed elettriche, alla loro biocompatibilità e alla facilità di lavorazione in film sottili. Nello specifico il polimero coniugato poli(etilenediossitiolfene)poli(stirenesulfonato) (PEDOT:PSS) sembra essere molto promettente date le interessanti proprietà biofisiche; inoltre esperimenti di crescita cellulare, condotti utilizzando fibroblasti dermici umani, hanno mostrato che è possibile influenzare la crescita cellulare modificando lo stato redox del PEDOT:PSS, utilizzato come substrato su cui far aderire le cellule [4].

Dopo aver illustrato brevemente lo "stato dell'arte" di questa recente linea di ricerca è giunto il momento di introdurre l'obiettivo di questo lavoro di tesi, il quale si inserisce in tale contesto, con lo scopo di studiare se e come lo stato di ossidazione del PEDOT:PSS possa influenzare l'attività dei canali di membrana, modificando di conseguenza le correnti ioniche. Per comprendere la significatività della correlazione tra le correnti ioniche e lo stato di ossidazione del PEDOT:PSS è stato necessario uno studio preliminare volto ad ottenere una caratterizzazione delle proprietà elettriche di membrana della linea cellulare utilizzata negli esperimenti. Questa analisi ha evidenziato la presenza sostanziale di canali del potassio, gran parte dei quali di tipo voltaggio-dipendenti come è stato possibile comprendere grazie ad applicazioni farmacologiche mirate.

Nel primo capitolo vengono presentate alcune nozioni di base sulla fisiologia cellulare, con particolare riguardo alle proprietà elettriche e alla struttura e composizione della membrana cellulare, fondamentale in molti processi vitali della cellula stessa. Nel secondo capitolo descriveremo la tecnica del *Voltage Clamp* utilizzata per acquisire le registrazioni delle correnti ioniche, illustrando dettagliatamente sia le varie parti che costituiscono l'apparato di misura, sia le modalità con cui sono state ottenute le misurazioni. Nel terzo si espongono brevemente le proprietà del polimero organico PEDOT:PSS, soprattutto per quanto riguarda gli aspetti più strettamente legati alla biocompatibilità e alla risposta cellulare in particolari condizioni. Il quarto capitolo è dedicato alla descrizione delle procedure e delle tecniche utilizzate ai fini delle misurazioni, con grande attenzione agli accorgimenti e ai materiali necessari alla coltivazione cellulare e al loro mantenimento e utilizzo. Nel quinto ed ultimo capitolo vengono presentati i risultati ottenuti dagli esperimenti riguardanti sia la caratterizzazione elettrofisiologica cellulare, eseguita in via preliminare, che le registrazioni ottenute su PEDOT:PSS; tali risultati sono stati successivamente completati dalle necessarie osservazioni al riguardo.

# Capitolo 1

## Elettrofisiologia cellulare

Questo capitolo ha lo scopo di introdurre i concetti alla base di questo elaborato. Inizieremo dalla descrizione delle proprietà cellulari di membrana e del loro legame con le correnti ioniche, chiariremo la differenza tra cellule elettricamente eccitabili e non, che ci permetterà di modellizzare il tipo di risposta cellulare a stimoli elettrici; infine procederemo con la descrizione dei canali ionici del potassio, il cui flusso rappresenta l'oggetto delle misurazioni di questa tesi sperimentale.

### 1.1 La membrana cellulare

Tutte le cellule degli organismi viventi sono dotati di una membrana cellulare o plasmatica in grado di separare il citoplasma della cellula, costituito da diversi organuli dispersi in una matrice fluida detta citosol, dall'ambiente extracellulare. In questo senso la membrana plasmatica è un elemento indispensabile alla vita della cellula in quanto svolge molte funzioni essenziali che potremmo sintetizzare nel modo seguente:

**protezione** tenere fuori dalla cellula le sostanze dannose e tossiche;

**trasporto** permettere il transito di tutte le sostanze necessarie alla vita cellulare;

**comunicazione** scambiare segnali chimici con cellule limitrofe.

Grazie a queste capacità della membrana plasmatica la cellula è in grado di preservare le condizioni omeostatiche fondamentali per il suo funzionamento, come ad esempio il mantenimento al suo interno delle giuste concentrazioni di ioni e sostanze nutritive indispensabili per lo sviluppo e il metabolismo cellulare. Come vedremo nei paragrafi successivi questa funzione selettiva, dovuta soprattutto alla sua particolare conformazione, ci permette di definirla come una *membrana semipermeabile* che permette il transito di alcune sostanze ed impedisce il passaggio di altre [5].

### 1.1.1 La struttura

La membrana plasmatica costituisce l'involucro esterno della cellula ed è formata da un doppio strato di fosfolipidi per uno spessore di circa 7-9 nm. Un fosfolipide è caratterizzato da una estremità in cui è presente un gruppo fosfato solubile in acqua, e per questo detta testa idrofila, e l'altra costituita da due catene di acidi grassi idrofobe. A causa di questa particolare composizione i due strati di fosfolipidi interagendo con gli ambienti acquosi circostanti si dispongono in modo tale da presentare le code apolari nella parte interna della membrana e le teste polari rivolte verso l'esterno.

Come riportato in *Figura 1.1* all'interno di questa struttura sono presenti ulteriori componenti. Le molecole di colesterolo hanno la duplice funzione di impedire il passaggio di piccoli aggregati molecolari e di conferire alla membrana plasmatica il giusto grado di fluidità. I diversi tipi di proteine possono affacciarsi ad un solo lato della membrana, e fungere ad esempio da proteine recetttrici o da supporto strutturale (proteine periferiche), oppure possono anche occupare per intero tutto lo spessore della membrana (proteine integrali) e avere il compito di facilitare o trasportare attivamente attraverso di essa sostanze polari, altrimenti impenetrabili perché insolubili nel doppio strato lipidico.

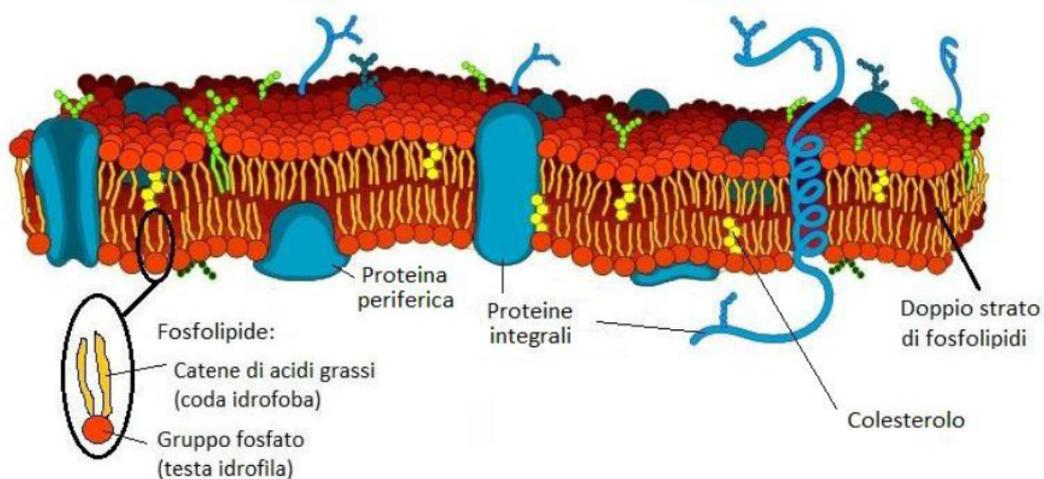


Figura 1.1: Struttura della membrana plasmatica.

In virtù di ciò possiamo immaginare la membrana cellulare come un mare di lipidi in cui galleggiano le proteine, con una consistenza talmente fluida che la maggior parte dei suoi componenti può spostarsi liberamente al suo interno formando configurazioni diverse con enorme dinamicità, da qui la definizione di *modello a mosaico fluido*.

### 1.1.2 I meccanismi di trasporto ionico

Al contrario dei composti apolari, come gli ormoni steroidei e i gas ( $O_2$  e  $CO_2$ ), che sono in grado di diffondere attraverso la membrana cellulare secondo il proprio gradiente di concentrazione, le specie chimiche cariche, come gli ioni e le grosse molecole polari (glucosio), hanno bisogno di strutture specifiche. La risposta a stimoli di natura elettrica coinvolge soprattutto le specie ioniche rappresentate da  $K^+$  e  $Na^+$ , per cui devono esistere proteine integrali che sono responsabili del trasferimento di questi ioni dentro e fuori la cellula.

Esse vengono chiamate proteine trasportatrici e possono essere distinte in base al tipo di energia che sfruttano per spostare le sostanze, come illustrato in *Figura 1.2*. Vengono definite di trasporto passivo se sfruttano il gradiente chimico e/o elettrico della sostanza da trasportare, come i canali ionici, oppure sono dette di trasporto attivo se utilizzano energia sotto forma di molecole di ATP per realizzare lo spostamento, come nel caso delle proteine carrier.

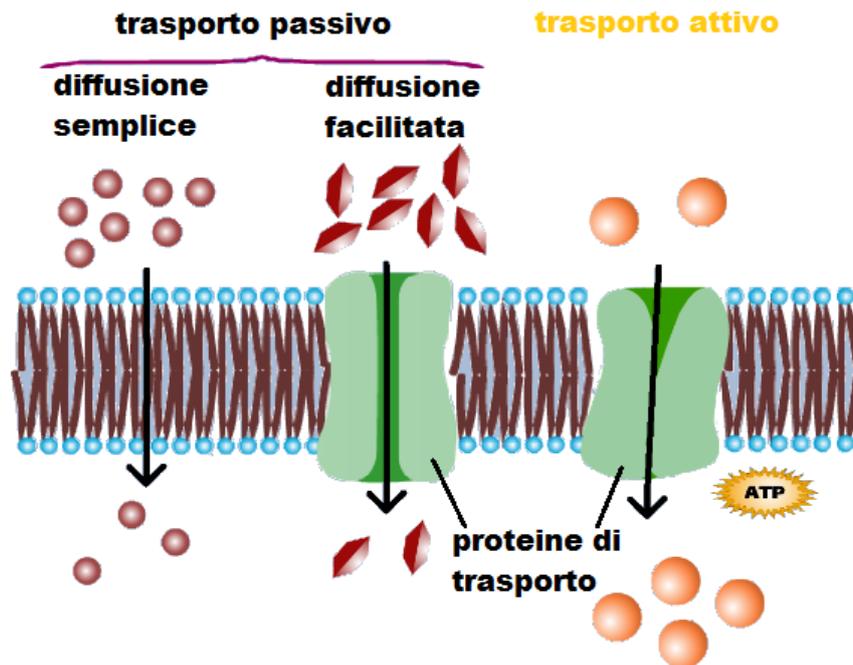


Figura 1.2: Trasporto passivo e trasporto attivo.

Molte di queste proteine hanno la caratteristica di modificare la propria forma in relazione a precisi stimoli esterni, come l'interazione con molecole particolari, o una variazione del potenziale di membrana. Grazie a queste caratteristiche le proteine di membrana svolgono un ruolo essenziale nella regolazione delle funzionalità elettriche e meccaniche dei vari tipi di cellule.

I canali ionici, a causa della loro permeabilità selettiva, possono essere specifici per uno ione, oppure possono consentire il passaggio a ioni simili per dimensioni e valenza; la loro selettività è determinata dal diametro del poro centrale e dalla carica elettrica degli amminoacidi che delimitano il lume del canale. Quando si ha l'apertura di un certo numero di canali ionici si ha un incremento della conduttanza elettrica di membrana che coincide con un aumento di permeabilità della stessa per lo specifico ione o gruppo di ioni a cui i canali permettono il transito.

Le proteine trasportatrici in senso stretto, chiamate anche carrier, si legano a substrati specifici e trasportano gli ioni attraverso la membrana cambiando conformazione. Un carrier che trasporta un solo tipo di molecola viene detto uniporto, ma di maggiore interesse sono i carrier che trasportano più soluti contemporaneamente; se i soluti si muovono nella stessa direzione attraverso la membrana si ha un carrier simporto, mentre se i soluti viaggiano in direzioni opposte si ha un carrier antiporto. Il trasporto attivo può essere primario nel caso venga utilizzata l'ATP come fonte di energia, o secondario quando l'energia per trasportare un soluto contro il proprio gradiente deriva dal gradiente di concentrazione di un'altra specie chimica.

Contrariamente ai canali ionici, i carrier operano più lentamente e la loro funzione principale è quella di ristabilire e mantenere il potenziale di riposo della membrana dopo una eventuale perturbazione. Un esempio notevole di proteina carrier è la pompa sodio potassio che è tra le principali proteine responsabili del mantenimento del potenziale di equilibrio nelle cellule, come vedremo nel seguito, e compie un trasporto attivo primario trasportando tre ioni sodio fuori dalla cellula e due ioni potassio all'interno, contro i propri gradienti di concentrazione, con funzione dunque di antiporto; il suo funzionamento è illustrato nella *Figura 1.3*.

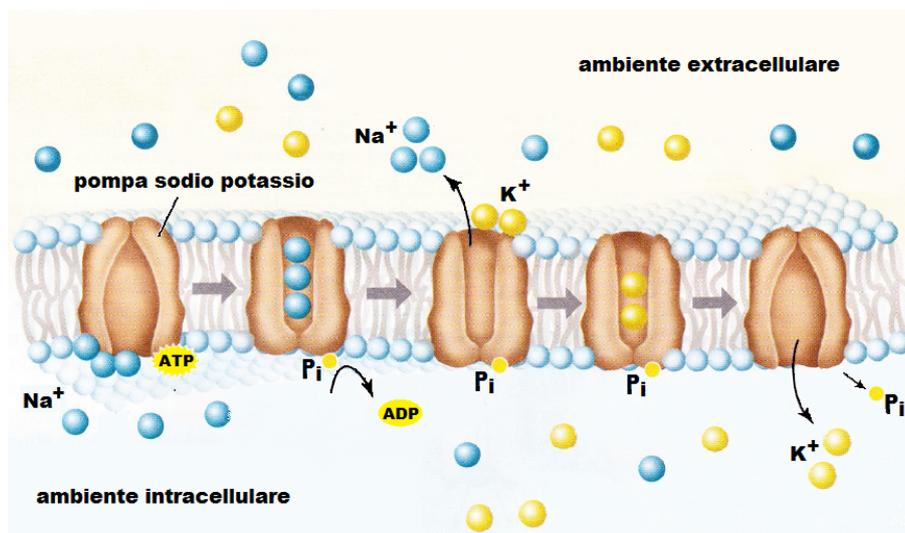


Figura 1.3: Meccanismo di funzionamento della pompa sodio potassio.

## 1.2 Le proprietá elettriche delle cellule

Tutte le cellule presentano in generale uno squilibrio di carica ai lati opposti della membrana, in questo modo si viene a creare un potenziale di membrana, che rappresenta l'elemento fondamentale per spiegare molte delle risposte cellulari a stimoli esterni, come ad esempio l'irritabilitá cellulare o la trasmissione di impulsi elettrici nel caso di cellule neuronali.

### 1.2.1 Il potenziale di membrana

Sebbene in condizioni di riposo l'ambiente interno della cellula possieda una carica globale sostanzialmente nulla, il citosol viene ad assumere un potenziale negativo rispetto all'ambiente extracellulare. Per capirne il motivo facciamo riferimento alla *Tabella 1.1* che riporta la distribuzione delle principali specie ioniche nei comparti intra ed extracellulari nel caso di una cellula di mammifero [6].

ioni	Concentrazione(mM)	
	intracellulare	extracellulare
Cationi		
$K^+$	140	4-5
$Na^+$	5-15	145
$Mg^{2+}$	0.5	1-2
$Ca^{2+}$	0.0001	2.5-5
Anioni		
$Cl^-$	4	110-117

Tabella 1.1: Concentrazioni ioniche intra ed extracellulari per cellula di mammifero.

Osservando le diverse concentrazioni ioniche é interessante notare come la carica intracellulare sembra essere nettamente positiva data la scarsa quantitá di ioni  $Cl^-$ . Questo apparente deficit di cariche anioniche viene tuttavia compensato da proteine intracellulari, poco mobili all'interno del citosol, non menzionate nella tabella.

Al contrario all'esterno della membrana le cariche elettriche non sono bilanciate e si osserva un eccesso di cariche positive; é proprio questo squilibrio di carica che fa assumere al citosol un potenziale elettrico negativo rispetto al potenziale esterno. Il campo elettrostatico generato da tali cariche positive, provoca fenomeni di induzione in prossimitá della membrana cellulare, la quale viene ad assumere le proprietá di una capacitá e tra le cui estremitá si sviluppa una differenza di potenziale elettrico in analogia ad un condensatore sferico.

Queste diverse distribuzioni ioniche sono dovute alla differente permeabilità della membrana plasmatica agli ioni; come già anticipato infatti la membrana cellulare é semipermeabile e di conseguenza, nello stato di riposo, gli ioni potassio  $K^+$  possono attraversarla facilmente, contrariamente agli ioni  $Cl^-$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e presentano piú difficoltà.

A questo punto risulterà chiaro come l'origine del potenziale di membrana derivi dall'azione combinata, sia di forze puramente diffusive generate dal gradiente di concentrazione delle specie chimiche, sia di forze attrattive di natura elettrica. Nello specifico il mantenimento dello stato stazionario di riposo, o di equilibrio, come già anticipato, é garantito dall'azione della pompa sodio potassio che mantiene attivamente le giuste concentrazioni ioniche ai lati della membrana affinché si sviluppino le necessarie interazioni (*Figura 1.4*).

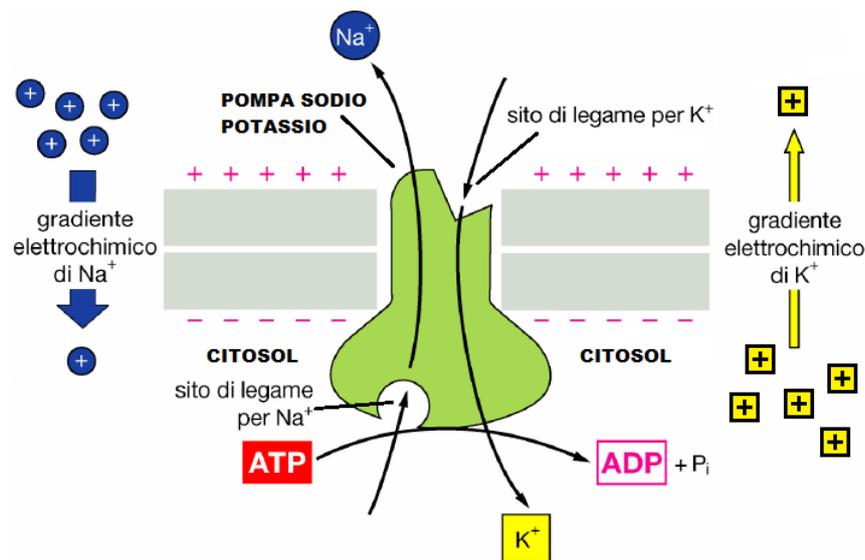


Figura 1.4: Implicazione della pompa sodio potassio nello sviluppo del potenziale di membrana a riposo.

Per descrivere in modo semplice tale concomitanza di eventi si definisce la grandezza *potenziale elettrochimico*, indicata con  $E$ , che esprime il movimento del flusso ionico all'interno o all'esterno di una cellula. Se consideriamo il movimento di un solo tipo di ione, ad esempio il potassio, possiamo approssimare il potenziale di membrana con l'equazione di Nernst [6]:

$$E_{K^+} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} \quad (1.1)$$

Le indicazioni *in* e *out* stanno ad indicare le concentrazioni intra ed extracellulari dello ione specifico,  $z$  indica la sua carica,  $R$  é la costante universale dei gas perfetti e  $F$  la costante di Faraday, che nel sistema internazionale valgono rispettivamente

8.314472J/Kmol e 96485,309C/mol, infine  $T$  é la temperatura assoluta espressa in Kelvin.

$E_{K^+}$  é definito potenziale di Nernst del potassio, o potenziale di inversione, chiamato in questo modo perché se il potenziale di membrana, durante una sua variazione, assume questo valore, si ha un inversione del verso di percorrenza degli ioni nell'attraversamento della membrana plasmatica con conseguente inversione della corrente ionica. L'equazione di Nernst permette di calcolare il potenziale di equilibrio di una sola specie ionica se si conosce esattamente la sua concentrazione nei due compartimenti cellulari. Inoltre possiamo osservare che il potenziale di equilibrio sarà positivo se il catione é piú concentrato nel fluido extracellulare, perché il rapporto  $[X]_{out}/[X]_{in} > 1$ , e ,al contrario, sarà negativo se lo ione é piú concentrato nel lato intracellulare. Ovviamente se lo ione é un anione si presenterá la situazione inversa perché la carica  $z$  é negativa.

Il piú delle volte questa approssimazione non riflette una condizione fisiologica accettabile. Nel caso di cellule neuronali, ad esempio, l'equazione di Nernst predice a riposo un potenziale di circa -90 mV, come se le cellule fossero permeabili solo al  $K^+$ , mentre in realtà i potenziali di riposo effettivamente misurati sono in media tra -60 e -70 mV, quindi piú positivi. Questo significa che altri ioni, come il  $Na^+$ , sono coinvolti nel mantenere il potenziale di riposo della cellula, e sebbene abbiano una permeabilità attraverso la membrana sicuramente meno significativa rispetto al potassio, sono in grado di entrare nella cellula e rendere il potenziale a riposo piú positivo. Un modello piú accurato in grado di predire il potenziale di riposo di una cellula permeabile a piú ioni, quando si conoscono le loro permeabilità specifiche attraverso la membrana é l'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz [6]:

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{\sum_i^N p_i [C_i^+]_{out} + \sum_i^N p_i [A_i^-]_{in}}{\sum_i^N p_i [C_i^+]_{in} + \sum_i^N p_i [A_i^-]_{out}} \right) \quad (1.2)$$

In questa formulazione si può osservare come i cationi  $C^+$  e gli anioni  $A^-$  diano contributi opposti nel definire il potenziale di membrana, inoltre con riferimento alla *Tabella 1.1* é chiaro che nelle cellule di mammifero  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$  sono i tre ioni che maggiormente influenzano il potenziale di membrana a riposo, per cui, con buona approssimazione, questa equazione può essere scritta utilizzando le informazioni provenienti solamente da questi tre ioni.

### 1.2.2 L'equivalente elettrico della membrana cellulare

Le modalità con cui avvengono le variazioni del potenziale di membrana in seguito a variazioni dei flussi di corrente, generati da gradienti elettrochimici e canali ionici, dipendono dalle proprietà elettriche della membrana plasmatica. Le proprietà elettriche passive della membrana cellulare, come si è già accennato nei paragrafi precedenti, sono rappresentate da una resistenza al passaggio di corrente e da una capacità. La prima è una conseguenza della presenza dei canali ionici, che determinano una conduttanza di membrana, mentre la seconda è dovuta al doppio strato fosfolipidico, che permette la separazione di cariche positive e negative, facendo assumere alla membrana cellulare un comportamento simile ad un condensatore [6]; queste considerazioni sono illustrate in *Figura 1.5*.

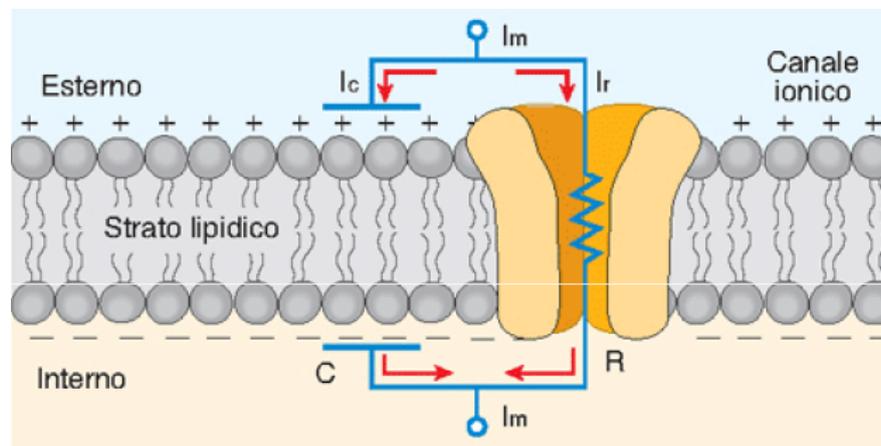


Figura 1.5: Analogia tra strutture biologiche della membrana e componenti elettrici.

Nello specifico le variazioni del potenziale di membrana dovute all'introduzione nella cellula di cariche elettriche seguono abbastanza fedelmente la legge di Ohm  $\Delta V = iR_M$ , dove la resistenza di membrana  $R_M$ , o semplicemente  $R$ , può essere scritta, approssimando la cellula ad una sfera di raggio  $r$ , come  $R_M = R_m/4\pi r^2$ , dove  $R_m$  è la resistenza specifica di membrana che dipende dal numero di canali aperti a riposo per unità di superficie e con dimensioni  $\Omega cm^2$ . Tramite questa approssimazione si può osservare come aumentando le dimensioni della cellula, e quindi la sua superficie,  $R_M$  diminuisce con legge di tipo quadratico; ciò comporta che a parità di stimolo, ossia di corrente introdotta nella cellula, la variazione del potenziale sarà maggiore in cellule piccole rispetto a quelle di dimensioni maggiori. Sperimentalmente si osserva che tale variazione di potenziale non è istantanea ma graduale, salendo lentamente fino a raggiungere il valore previsto dalla legge di Ohm  $\Delta V = iR_M$ , per poi, cessato lo stimolo, discendere altrettanto lentamente; questo comportamento è riconducibile alla capacità di membrana  $C_M$ , indicata anche con  $C$  nel seguito.

L'entitá di questa capacitá deriva dalla quantitá di carica accumulabile sulle due superfici intra ed extracellulare in seguito ad una variazione del potenziale di membrana secondo la nota legge  $\Delta V = \Delta Q/C_M$ , inoltre é direttamente proporzionale alla superficie della membrana plasmatica che costituisce le armatura del condensatore, infatti considerate le dimensioni dello spessore della membrana molto minori rispetto alla superficie di una generica cellula, vale la relazione classica  $C_M = \epsilon S/d$ . Tuttavia date le caratteristiche standard delle membrane biologiche é conveniente definire una capacitá specifica per unitá di superficie  $C_m = 1\mu F/cm^2$  e definire la capacitá di membrana, in modo simile a quanto fatto con  $R_M$ , come  $C_M = C_m 4\pi r^2$ .

Come mostrato in *Figura 1.6* possiamo dunque facilmente modellizzare le caratteristiche delle membrane biologiche come una resistenza in parallelo ad una capacitá.

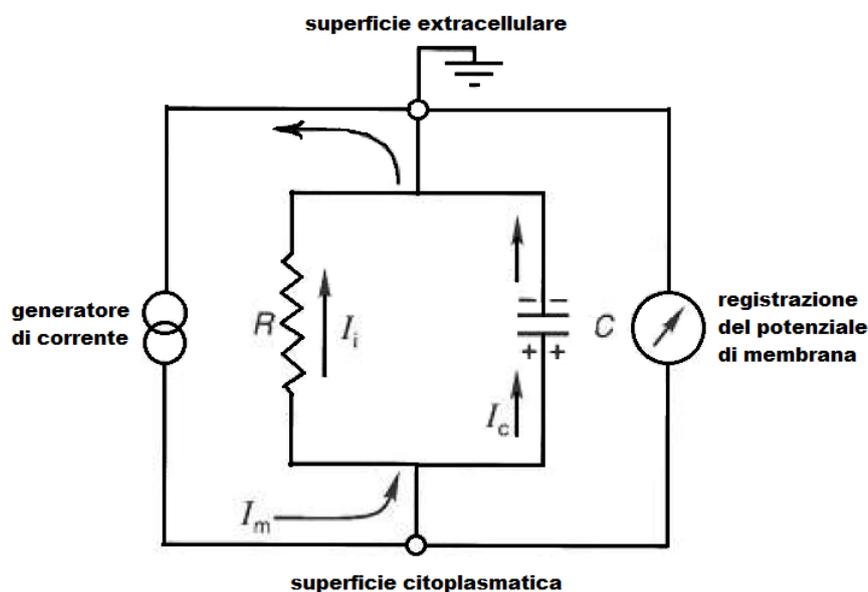


Figura 1.6: Equivalente elettrico circuitale della membrana plasmatica.

In questo schema  $I_m$  rappresenta la corrente che scorre attraverso la membrana con  $I_m = I_r + I_c$  dove  $I_r$  é la corrente ionica o resistiva, determinata dal flusso di ioni attraverso i canali ionici e  $I_c$  é la corrente capacitiva, generata dalla variazione di carica sulla membrana. All'atto di uno stimolo, inizialmente, tutta la corrente va a caricare progressivamente il condensatore, man mano che il condensatore si carica aumenta la corrente che fluisce nella resistenza fino a quando si carica completamente e tutta la corrente attraversa  $R$ ; alla fine dell'impulso la corrente generata dalla scarica del condensatore passerá attraverso  $R$ , determinando un lento ritorno del potenziale di membrana  $V_m$  al valore iniziale.

Le equazioni differenziali che definiscono questo modello elettrico, rispettivamente nella fase crescente e decrescente del potenziale di membrana, sono riassumibili nel modo seguente:

$$\Delta V_m(t) = I_m R (1 - e^{-t/\tau}) \quad (1.3)$$

$$\Delta V_m(t) = I_m R e^{-t/\tau} \quad (1.4)$$

La costante di tempo  $\tau = RC$  é la medesima per entrambi i processi e rappresenta una misura del tempo di risposta caratteristico del circuito. In pratica indica il tempo richiesto per caricare il condensatore al 63.2% della sua capacità di carica totale. Per valori di  $R_m$  compresi tra 10 e 10.000  $\Omega cm^2$  e  $C_m = 1mF/cm^2$  la costante di tempo varia da 10 $\mu s$  a 10ms.

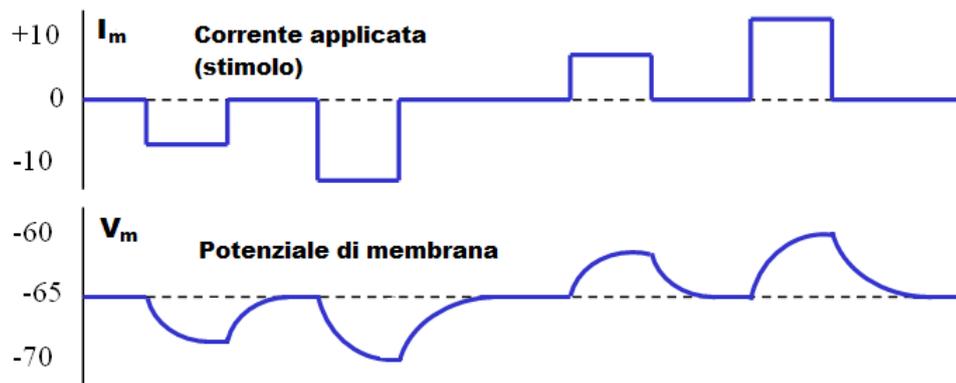


Figura 1.7: Potenziale graduato.

In *Figura 1.7* é riportata, a titolo dimostrativo, la risposta cellulare del potenziale di membrana a diversi stimoli di corrente con forma ad onda quadra, detta anche *potenziale graduato*. Questo tipo di risposta passiva, modulabile in ampiezza e che decresce man mano che ci si allontana dal punto di origine, caratterizza una classe particolare di cellule, dette elettricamente non eccitabili, di cui fanno parte ad esempio i fibroblasti e le cellule utilizzate in questo lavoro di tesi. Come osservato questa tipologia di cellule possiede determinate proprietà elettriche ma queste si esprimono in modo totalmente diverso da cellule cosiddette elettricamente eccitabili, come quelle neuronali o muscolari, che sono in grado di generare un *potenziale d'azione*, ossia una risposta non graduabile in ampiezza ma modulabile in frequenza e che si propaga a distanza senza decremento.

## 1.3 Il modello di Hodgkin e Huxley

Data la sua grande rilevanza sia dal punto di vista storico, che tecnico/sperimentale, in questa sezione esamineremo brevemente il primo modello di interpretazione dei fenomeni elettrici che caratterizzano le cellule elettricamente eccitabili, ossia tutte quelle cellule in grado di generare potenziali d'azione [7].

Gli esperimenti che diedero le informazioni necessarie per lo sviluppo di tale modello sono stati svolti utilizzando i neuroni del calamaro europeo in quanto presenta un assone di notevoli dimensioni, di diametro dell'ordine di 1mm, rispetto al soma di quelli di un mammifero che raggiunge in media solo  $70\mu m$ .

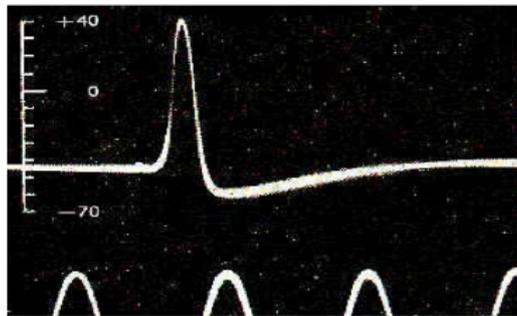


Figura 1.8: Una delle prime misure di Hodgkin e Huxley del potenziale d'azione.

Per spiegare l'origine del potenziale d'azione, di cui si riporta in *Figura 1.8* l'andamento in funzione del tempo di una delle prime curve ottenute dagli autori, Hodgkin e Huxley supposero che la depolarizzazione della membrana, a partire dallo stato di riposo, favorisse l'apertura di determinati canali del  $Na^+$  presenti sulla membrana neuronale. Ciò provoca un notevole ingresso di ioni sodio all'interno della cellula, e se tale perturbazione é in grado di depolarizzare il potenziale oltre una certa soglia, si origina una fase ascendente del potenziale d'azione. A questa prima fase, segue la fase discendente, causata dalla progressiva inattivazione dei canali  $Na^+$ , che riduce l'ingresso nella cellula di questo ione e contemporaneamente provoca l'apertura dei canali  $K^+$ , che determina una maggiore fuoriuscita di ioni potassio dal neurone.

Nel circuito elettrico sviluppato da Hodgkin e Huxley (*Figura 1.9*), la capacità della membrana cellulare é rappresentata da  $C_M$ , le correnti ioniche principali sono indicate con le conduttanze  $g_{Na}$  e  $g_K$  variabili nel tempo e la forza elettromotrice che spinge questi ioni attraverso la membrana é indicata rispettivamente con  $E_{Na}$  e  $E_K$ , che non sono altro che i relativi potenziali di Nernst. Nell'ultimo ramo di circuito si tiene conto della corrente di *leakage*, ossia di tutti quei particolari canali ionici di dispersione che sono alla base del mantenimento del potenziale di riposo, ma in quanto tali hanno un'attività indipendente dal tempo e riassumibile nella conduttanza  $g_l$ , che può quindi essere considerata una costante.

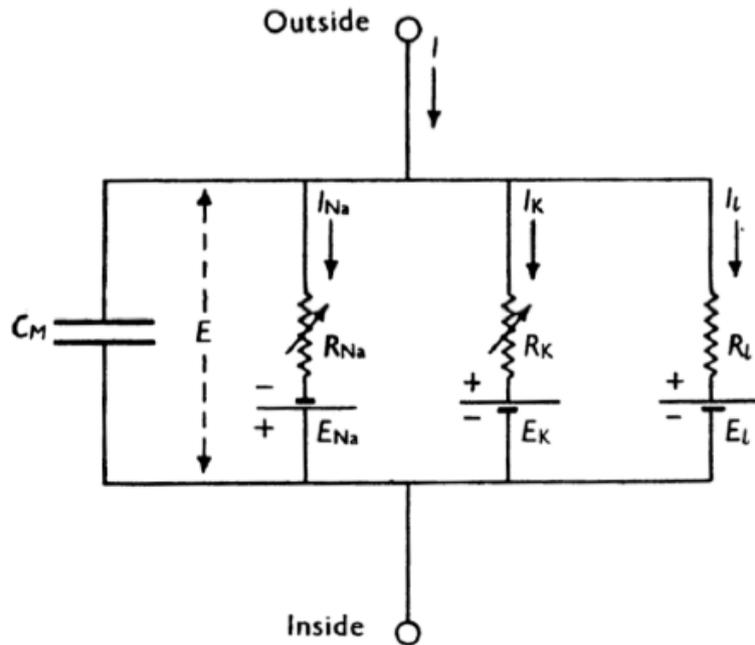


Figura 1.9: Equivalente elettrico del modello.

Facendo riferimento al circuito di *Figura 1.9* e facendo uso della legge di Kirchhoff, la corrente totale  $I$ , come già accennato, è data dalla somma di una componente capacitiva  $I_c$  e di una componente resistiva  $I_r$ , dovuta ai tre contributi ionici considerati:

$$I = I_c + I_r \quad (1.5)$$

dove le correnti  $I_c$  e  $I_r$  valgono rispettivamente:

$$I_c = C_M \frac{dV}{dt} \quad (1.6)$$

$$I_r = I_{Na} + I_K + I_l = g_{Na}(V - V_{Na}) + g_K(V - V_K) + g_l(V - V_l) \quad (1.7)$$

e con  $V$  si è indicato la variazione, misurata sperimentalmente, rispetto al potenziale di riposo. Sostituendo queste relazioni nella 1.5 possiamo scrivere:

$$I = C_M \frac{dV}{dt} + g_{Na}(V - V_{Na}) + g_K(V - V_K) + g_l(V - V_l) \quad (1.8)$$

In base ai risultati ricavati sperimentalmente con la tecnica del *patch clamp*, Hodgkin e Huxley trovarono che la conduttanza  $g_{Na}$  é proporzionale alla terza potenza di una variabile che é soluzione di un'equazione differenziale del primo ordine e di un termine che tiene conto dell'inattivazione progressiva dei canali del sodio. In modo simile, la conduttanza  $g_K$  é proporzionale alla quarta potenza di una variabile che é soluzione anch'essa di un'equazione differenziale del primo ordine.

Queste relazioni possono essere scritte nel modo seguente:

$$g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad (1.9)$$

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad (1.10)$$

dove  $\bar{g}_{Na}$  e  $\bar{g}_K$  sono delle costanti che rappresentano il massimo valore raggiungibile dalle conduttanze e  $m$ ,  $h$ ,  $n$  sono adimensionali e assumono valori compresi nell'intervallo  $[0,1]$ .

E' interessante sottolineare che gli autori per verificare la loro ipotesi dovettero misurare le variazioni delle conduttanze di membrana in funzione della tensione ai capi della membrana. Queste misurazioni presentavano notevoli difficoltà a causa del mutuo accoppiamento tra il potenziale di membrana e le conduttanze stesse, dovuto al fatto che, se la membrana é depolarizzata, si ha l'apertura dei canali del sodio e l'ingresso dello ione provoca un'ulteriore depolarizzazione. Tale comportamento rendeva quindi impossibile il mantenimento di un potenziale di membrana costante.

Questi problemi furono risolti mediante la tecnica chiamata *voltage clamp* o "blocco del voltaggio" che rappresenta la tecnica base utilizzata in questo lavoro di tesi e che svilupperó nel dettaglio nel prossimo capitolo.

## 1.4 I canali ionici del potassio

Lo studio sistematico dei canali ionici del potassio é abbastanza recente e considerato che mostrano proprietá elettrofisiologiche molto diversificate, la loro classificazione é oggetto di continue modifiche relativamente alle scoperte scientifiche. La ragione di ciò risiede nella profonda complessitá a livello molecolare di queste proteine di membrana da cui deriva una straordinaria capacitá selettiva.

In via del tutto generale oggi sappiamo che i canali ionici sono proteine composte, per la maggior parte, da quattro subunitá di  $\alpha$  eliche, ognuna codificata da un suo proprio mRNA, che formano una struttura quaternaria. Le proteine canale possiedono diverse zone, dette domini, risultanti dalla giustapposizione delle quattro catene polipeptidiche, caratteristici per ciascuna di esse [8]; in *Figura 1.10* é riportato un disegno esplicativo.

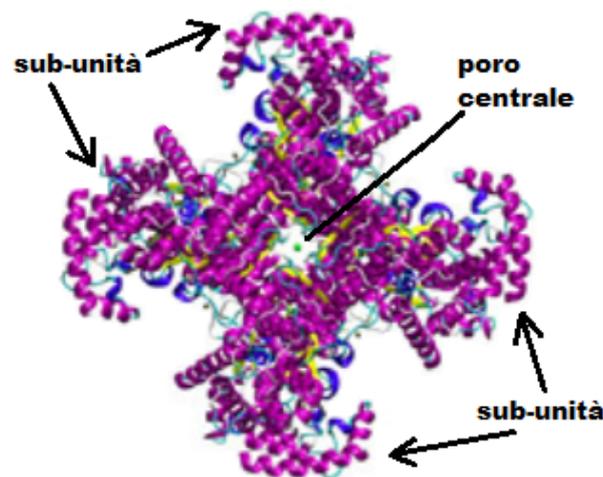


Figura 1.10: Rappresentazione di un generico canale ionico per il potassio.

Nell'area centrale del canale ionico sono presenti particolari aminoacidi di natura idrofobica che ancorano la proteina intera alla membrana. All'interno del dominio del poro é presente una struttura altamente specializzata, detta filtro di selettivitá, in grado di selezionare per esempio gli ioni potassio e non quelli del sodio, e ne consente il passaggio attraverso la membrana cellulare. La struttura di questo filtro consiste in una gabbia tridimensionale, della forma approssimativamente cilindrica, in cui sono presenti atomi di ossigeno che conducono lo ione potassio da un lato all'altro della membrana cellulare.

L'elevata variabilitá di questi canali é da ricondursi al fatto che per ogni organismo esistono diversi geni che codificano per le subunitá della proteina, inoltre, sia la formazione di isoforme diverse tramite lo *splicing alternativo*, che l'associazione con ulteriori subunitá accessorie possono complicarne la struttura.

Per questi motivi oggi si preferisce raggruppare i canali ionici del  $K^+$  in base al numero di segmenti transmembranari, classificazione che da origine a tre categorie, come illustrato nella tavola riassuntiva di *Figura 1.11*.

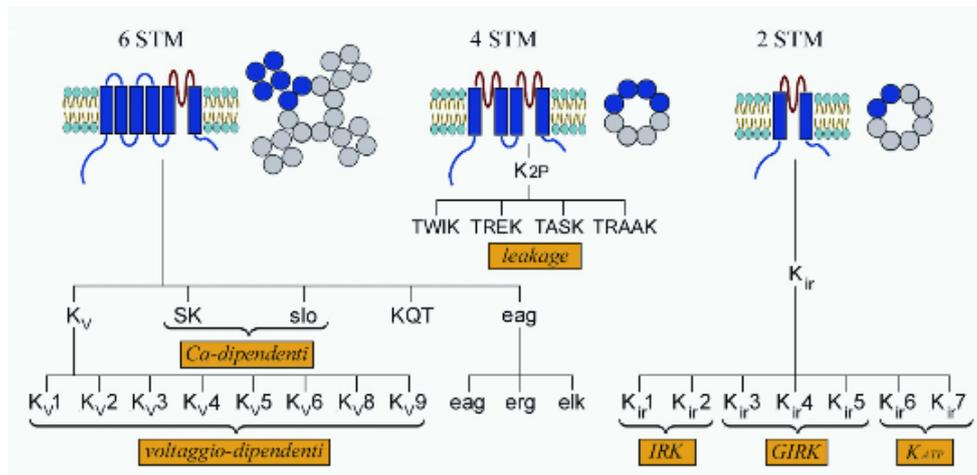


Figura 1.11: Classificazione dei canali ionici per il potassio.

Il primo gruppo è quello che ci interessa maggiormente perché comprende i canali *voltage-dipendenti* che sono i diretti interessati di questo tipo di studio. Le quattro subunità presentano sei segmenti transmembrana corredati di sensori specifici del voltage. La famiglia  $K_v$  è una classe di canali ionici molto vasta e ognuno di questi possiede diverse varianti; nello specifico il tipo  $K_v1.4$  viene etichettato come canale potassio rappresentativo del “tipo A” e mostra una inattivazione molto rapida, mentre il  $K_v3.1$  viene indicato come esempio per i canali “delayed rectifier” ( $K_{DR}$ ) con inattivazione debole o praticamente assente [9]. Rispetto al  $K_{DR}$ , il  $K_A$  si attiva a potenziali più negativi e si inattiva tanto più rapidamente quanto maggiore è la depolarizzazione, come si osserva in *Figura 1.12*, dove sono riportate, le correnti ioniche in risposta al protocollo di stimolazione adottato.

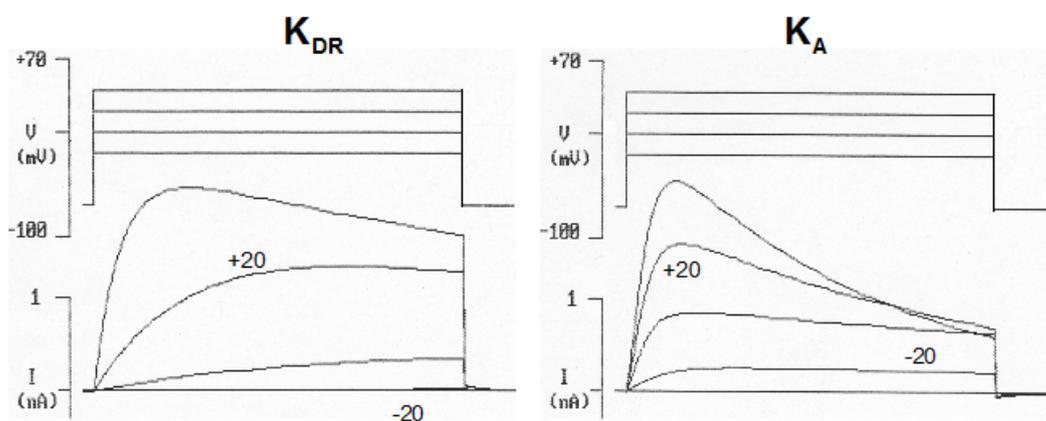


Figura 1.12: Correnti potassio registrate in voltage clamp.

Un'altra classe di canali molto importante per la tipologia di cellule usate in questo studio è quella dei canali del  $K^+$  *ligando-dipendenti* la cui apertura è regolata dalla presenza nel citosol di ioni  $Ca^{2+}$ , da cui il termine ( $Ca^{2+}$ )-*activated*  $K^+$  *channels*, che

possono essere liberati da vescicole intracellulari o fatti permeare spontaneamente all'interno della cellula immettendo, ad esempio, apposite sostanze nella matrice extracellulare. Vengono distinti in base alla conduttanza di singolo canale in tre sottogruppi ma, data la loro rilevanza numerica, i piú interessanti sono sicuramente i canali ad alta conduttanza identificati anche con la sigla *BK*.

I restanti gruppi di canali ionici del potassio sono di interesse meno rilevante in quanto permettono il passaggio di una debole corrente uscente necessaria per il mantenimento del potenziale di riposo, e sono i principali responsabili del "leakage" del  $K^+$ .

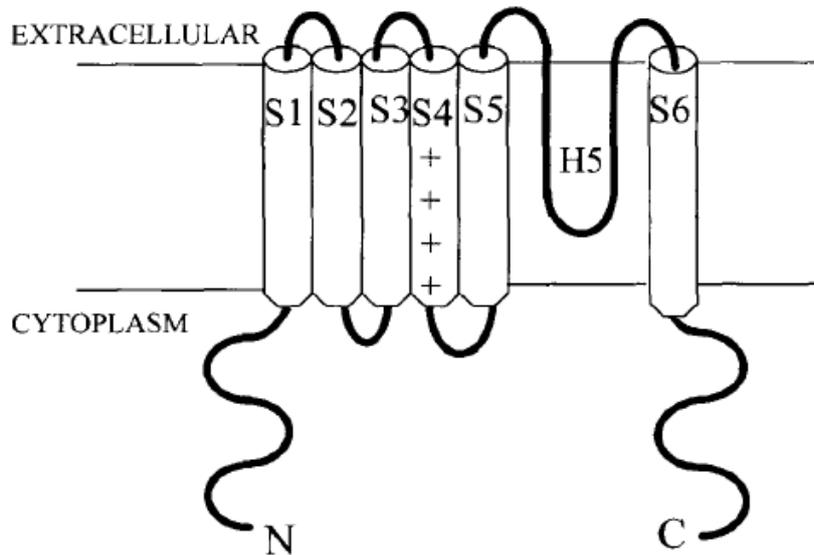


Figura 1.13: Schema di una subunità  $\alpha$  per un generico canale  $K_v$ .

Per quanto riguarda i meccanismi di inattivazione li distinguiamo principalmente in due categorie: *inattivazione di tipo N* e *inattivazione di tipo C* [8].

Nel primo caso l'estremità N-terminale di ciascuna delle quattro subunità  $\alpha$  della proteina (Figura 1.13) è costituita da un peptide, una sorta di "tappo", collegato alla restante parte della proteina mediante un tratto flessibile, da cui il nome "ball and chain". Il peptide è dotato di cariche parziali positive, in grado di interagire con cariche parziali negative posizionate all'imboccatura intracellulare del canale. In questo modo una variazione di pH o l'interazione con specifiche sostanze possono favorire l'innesco del meccanismo di inattivazione del canale. Il secondo meccanismo, piú lento rispetto al primo, è stato scoperto dopo aver osservato che in alcuni canali, dopo la rimozione dell'estremità N-terminale, persiste una lenta riduzione della corrente al perdurare della depolarizzazione. Presumibilmente tale meccanismo è dovuto ad una deformazione strutturale della proteina che restringe il filtro di selettività.

### 1.4.1 Blocco farmacologico

La caratterizzazione delle proprietà elettriche delle cellule consiste nell'individuazione del tipo di ione, delle correnti osservate e dei canali attraverso i quali questa corrente fluisce. Comprendere quali sono i canali ionici principali coinvolti nella risposta cellulare allo stimolo può essere molto complesso a causa della loro grande variabilità. A questo si aggiunge la variabilità intrinseca dei campioni biologici, come ad esempio nel caso che alcuni canali siano attivi solamente in determinate condizioni fisiologiche, oppure che non facciano parte del fenotipo della cellula e quindi non siano espressi. Esistono sia in natura che come prodotti di sintesi, molecole che legandosi a determinati siti delle proteine canale sono in grado di modificare la permeabilità allo ione. Queste sostanze si dicono bloccanti o inibitori farmacologici.

Poiché le correnti che si registrano in seguito a stimolazione della membrana cellulare sono dovute ai meccanismi di risposta dei canali voltaggio-dipendenti del  $Na^+$  e del  $K^+$  prenderemo in considerazione i principali bloccanti che riguardano questi canali. Per quanto concerne i canali del  $Na^+$  il principale trattamento farmacologico in grado di bloccare l'attività è la *tetrodotossina* (TTX), una delle più potenti neurotossine di natura non proteica nota nella letteratura orientale e nella storia giapponese per gli effetti paralitici e mortali che comporta il consumo di "pesce palla", specie appartenente alla famiglia dei Tetraodontidae. Si tratta di una molecola che si presenta come un solido cristallino bianco con formula bruta  $C_{11}H_{17}N_3O_8$ , prodotta da batteri marini come *Vibrio* e *Pseudomonas sp.* in grado di ostruire il foro centrale dei canali del sodio grazie all'instaurarsi di interazione elettrostatiche [10].

Per quanto riguarda il flusso ionico del  $K^+$  ci concentreremo solamente su alcuni dei principali bloccanti che agiscono in modo specifico su questo tipo di canali perché saranno utilizzati negli esperimenti di questo studio. Uno dei bloccanti che ha maggior effetto su gran parte dei canali potassio è lo ione quaternario di ammonio, chiamato anche *tetraetilammonio* (TEA), che agisce in modo generico sopprimendo la corrente potassio uscente dalla cellula. Nello specifico è in grado di bloccare perfettamente i canali del potassio attivati dal  $Ca^{2+}$ , sia a bassa che ad alta conduttanza, compresi quindi i canali BK. Per quanto riguarda la famiglia dei  $K_v$  è in grado di bloccare più facilmente i canali che presentano un residuo di cisteina all'estremità carbossilica della regione P della subunità  $\alpha$ , ossia  $K_v1.1$ ,  $K_v1.6$ ,  $K_v2.1$ ,  $K_v2.2$ ,  $K_v3.1 - K_v3.4$ . In caso di assenza dell'aminoacido si dimostra 100 volte meno efficace, nel senso che per ottenere lo stesso effetto sulle correnti ioniche sono necessarie concentrazioni 100 volte maggiori [9].

Il meccanismo di inattivazione è dovuto al fatto che questo ione ha delle proprietà simili a quelle dell'estremità N-terminale del canale del  $K^+$ , come l'affinità per alcuni aminoacidi idrofobici posti all'imboccatura del canale, che gli permette di legarsi stabilmente alla proteina e bloccare fisicamente il flusso di potassio a causa del proprio ingombro sterico. Il

TEA ha effetto solamente sui canali che sono inizialmente aperti, ed é in grado di bloccare anche i canali voltaggio-dipendenti che si attivano in seguito a depolarizzazione della membrana plasmatica. Gli unici canali del  $K^+$  che risultano meno sensibili all'azione del TEA sono quelli di tipo A, che abbiamo indicato con  $K_A$ , e per questo motivo scoprirne l'esistenza é abbastanza semplice in quanto basta osservare se nelle curve corrente vs tempo é presente una corrente potassio residua, con andamento simile a quello osservato in *Figura 1.12*.

Altri bloccanti del potassio sono invece piú specifici in quanto sono in grado di inattivare solamente alcuni tipi di canali. Un esempio é l'iberiotossina (IbTx), un peptide di 37 aminoacidi estratto dal veleno di scorpione, che rappresenta un potente bloccante dei canali del potassio BK [11]. In questo caso l'occlusione dei canali esterni del potassio é dovuta principalmente all'interazioni di natura elettrostatica tra le cariche negative localizzate all'entrata del canale e le cariche positive residue presenti su alcuni aminoacidi della tossina.

Come l'iberiotossina anche le dendrotossine (DTx) sono neurotossine, isolate per la prima volta nel 1980 dal veleno di mamba verde, e sono piccole proteine di circa 60 monomeri che presentano degli aminoacidi carichi positivamente, nello specifico Lisina e Arginina, in grado di interagire con le cariche negative degli aminoacidi del canale, causando un cambiamento conformazionale che ne impedisce il funzionamento [12]. In generale i canali potassio sensibili al meccanismo di inattivazione delle dendrotossine sono quelli voltaggio dipendenti della classe  $K_v1$ , in particolare i canali  $K_v1.1$  e  $K_v1.2$  [13].

Per maggior chiarezza nella *Tabella 1.2* sono riassunte le diverse tipologie di canali ionici del potassio sensibili ai bloccanti di cui abbiamo parlato, con le relative concentrazioni di lavoro [14].

<i>TEA</i> (10mM)	<i>IbTx</i> (100nM)	<i>DTx</i> (100nM)
$K^+$ attivati $Ca^{2+}$	BK	$K_v1.1$
$K_v1.1$		$K_v1.2$
$K_v1.6$		
$K_v2.1 - K_v2.2$		
$K_v3.1 - K_v3.4$		

Tabella 1.2: Specifici canali del potassio inibiti da TEA, IbTx e DTx.

# Capitolo 2

## La tecnica del Voltage Clamp

Molti dei risultati che ci hanno permesso di sviluppare una migliore comprensione dei fenomeni legati alla permeabilità ionica della membrana cellulare, come ad esempio l'interpretazione dei meccanismi di trasmissione dei segnali elettrici nelle cellule degli assoni e dei muscoli, derivano da esperimenti nei quali si è usato il metodo del blocco del voltaggio, ossia la tecnica del voltage clamp. In questo capitolo descriveremo in dettaglio i fondamenti della tecnica, alcune implicazioni da tenere in considerazione e l'apparato sperimentale necessario alla registrazione delle correnti.

### 2.1 Fondamenti della tecnica

Eseguire un esperimento di voltage clamp significa controllare elettricamente il potenziale di membrana. Anziché iniettare impulsi di corrente ad onda quadra e osservare la risposta del potenziale di membrana, procedura di base della tecnica originale del patch clamp, in questo caso si sottopone la membrana a variazioni improvvise del potenziale, o per meglio dire, ad un protocollo di stimolazione costituito da potenziali a gradini di diversa ampiezza, e si registra la corrente che deve essere erogata dall'apparecchiatura sperimentale in ogni istante per mantenere costante il potenziale presente sulle due lati della membrana cellulare [15]. Il voltage clamp è il tipico test che viene utilizzato per studiare la cinetica dei canali ionici voltaggio-dipendenti; infatti, essendo l'attività di molti canali del  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  dipendente dal potenziale di membrana, manipolare questa variabile ha il vantaggio di controllare e analizzare i cambiamenti di stato di questi canali. Come vedremo in dettaglio nel seguito la funzione fondamentale del circuito di blocco del voltaggio è quella di impedire la mutua interazione fra apertura e chiusura dei canali ionici voltaggio-dipendenti e il potenziale di membrana.

La corrente elettrica fluisce attraverso la membrana sia come corrente ionica, o resistiva,  $I_r$ , che come corrente capacitiva, che abbiamo in precedenza indicato con  $I_c$ . Ricordando che il valore di  $V_m$  è in ogni istante proporzionale alla carica presente sulla membrana,

finché il potenziale non varia anche la carica si mantiene costante e non si ha alcun flusso di corrente capacitiva. La corrente capacitiva fluisce soltanto quando è in corso una variazione di  $V_m$ . Di conseguenza, quando si impone alla membrana una brusca variazione di potenziale, ad esempio con uno stimolo a gradino, si avrà un flusso di corrente capacitiva solo all'inizio e alla fine del gradino stesso; infatti questo tipo di risposta è praticamente istantanea e può essere facilmente distinta dalle correnti ioniche più tardive. Quindi dopo una prima fase transiente si avrà solo il contributo della corrente ionica, che è quello che ci interessa.

La tecnica del voltage clamp, richiede una misura affidabile della corrente di membrana e un rapido controllo del potenziale di membrana; ciò si realizza mediante un circuito elettronico a feed-back negativo, il cui schema generale è riportato in *Figura 2.1*.

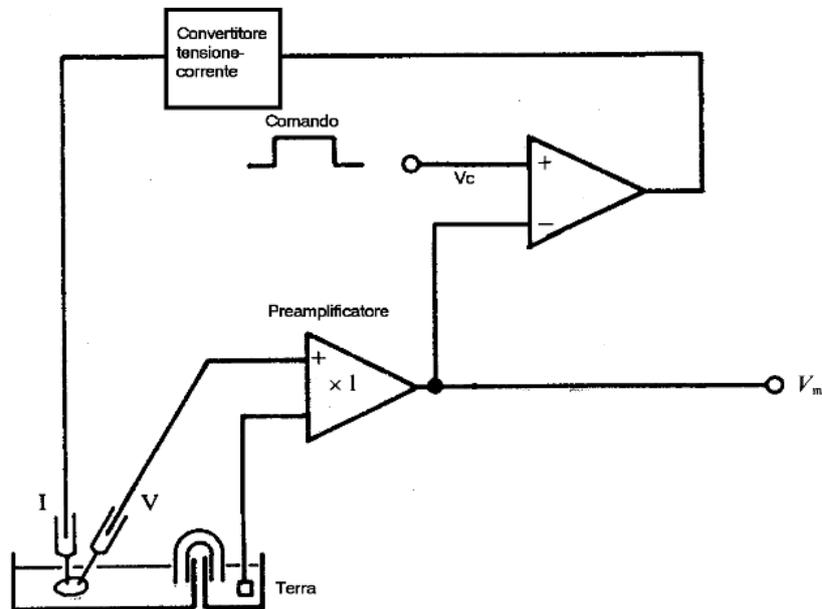


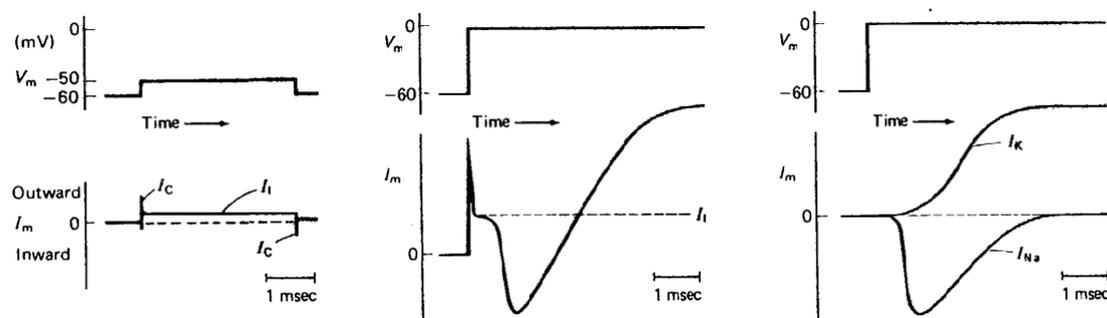
Figura 2.1: Schema elettrico essenziale su cui è basata la tecnica del voltage clamp.

Il controllo automatico del potenziale di membrana viene ottenuto monitorandolo con un elettrodo, detto "di voltaggio",  $V$ , e confrontandolo con il potenziale desiderato, che rappresenta il comando di voltaggio, cioè lo stimolo in tensione che si vuole applicare alla cellula. Questi due valori di potenziale vengono inviati ai due ingressi di un amplificatore differenziale; il segnale in uscita dall'amplificatore differenziale sarà uguale a zero se il potenziale di membrana coincide con il potenziale voluto dallo sperimentatore, mentre in tutti gli altri casi sarà proporzionale alla differenza fra il potenziale di membrana e il potenziale voluto dallo sperimentatore. Il segnale in uscita dall'amplificatore differenziale viene poi inviato al circuito di voltage clamp, costituito principalmente dal convertitore tensione-corrente, il quale provvede a generare una corrente di intensità e verso tali da correggere l'errore, corrente che viene infine iniettata nella cella mediante un secondo elettrodo, detto "di corrente" ed indicato con  $I$  nello schema; in realtà nel corso degli anni

la tecnica ha subito vari perfezionamenti e sono state sviluppate particolari configurazioni per cui é possibile utilizzare un solo elettrodo, come vedremo nel seguito. In pratica quindi l'amplificatore differenziale genera un segnale d'errore mentre il circuito di voltage clamp genera un segnale che tende a minimizzare questo errore, da qui la definizione di circuito a feedback negativo. Questa corrente generata dal circuito di voltage clamp viene quindi misurata, e costituisce l'informazione di output fornita da questo tipo di esperimento.

## 2.2 Registrazione di correnti

In questa sezione analizziamo i risultati di un generico esperimento di voltage clamp, cercando di comprendere cosa rappresenta la corrente che si registra in output in funzione del tempo e quali modificazioni subisce al variare del potenziale di stimolazione. Come é consuetudine in letteratura la corrente uscente é considerata positiva, cioé compare nel semiasse positivo delle ordinate, mentre la corrente entrante é considerata negativa e occupa il semiasse negativo.



(a) Corrente di output con depolarizzazione di +10 mV. (b) Corrente di output con depolarizzazione di +60 mV. (c) Separazione della corrente di output in due contributi.

Figura 2.2: Stimoli di diversa ampiezza e attivazione canali voltaggio-dipendenti.

Sulla base di quanto appreso in precedenza possiamo partire dalla situazione mostrata in *Figura 2.2(a)* in cui il potenziale di membrana é fissato al suo valore di riposo di -60 mV. Se sottoponiamo la membrana ad una depolarizzazione di 10 mV, osserviamo inizialmente una brevissima corrente capacitiva uscente  $I_c$ , che scarica istantaneamente la capacità della membrana. Tale corrente é seguita da una corrente ionica uscente, di intensità minore, che persiste per tutta la durata dell'impulso depolarizzante. Cessata la stimolazione e tornando alle condizioni iniziali, si osserva una breve corrente capacitiva, questa volta entrante, mentre la componente ionica si annulla. La corrente costante é dovuta al flusso di ioni attraverso i canali di leakage che sono sempre aperti e, come

sappiamo, sono rappresentati per la maggior parte da canali permeabili ai  $K^+$ , oltre che al  $Cl^-$  e  $Na^+$ , e sono i principali responsabili della genesi del potenziale di riposo.

Se invece si effettuano depolarizzazioni di entità maggiore, i tracciati delle correnti che si ottengono e la loro interpretazione divengono assai più complicati. Sia le correnti capacitive che quelle di fondo hanno intensità maggiore. Inoltre, immediatamente dopo l'esaurimento delle correnti capacitive e l'inizio di quelle di fondo, si osserva una corrente entrante che raggiunge il suo valore massimo entro pochi millisecondi, poi si riduce di ampiezza e viene sostituita da una corrente uscente. La corrente uscente raggiunge un plateau che viene poi mantenuto per tutta la durata della depolarizzazione. L'interpretazione di questo esperimento è che lo stimolo in tensione cui si sottopone la membrana cellulare apre, in successione, le conduttanze dei canali voltaggio-dipendenti del sodio e del potassio, il primo responsabile della corrente entrante e il secondo di quella uscente.

Per chiarire maggiormente il significato di tutto questo prendiamo ad esempio la *Figura 2.3* dove si riporta nel dettaglio la risposta della corrente ionica a diversi stimoli in tensione per una cellula nervosa.

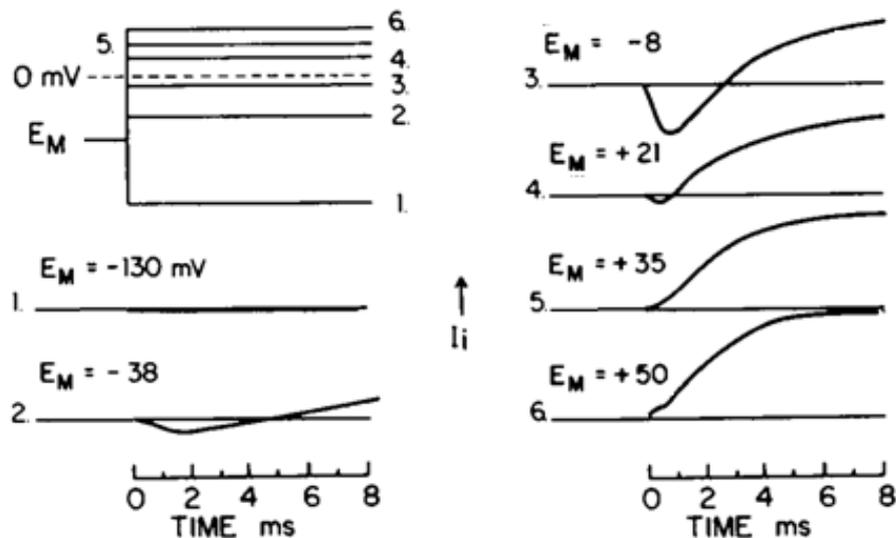


Figura 2.3: Esempio di correnti ioniche registrate in funzione del tempo per diversi potenziali di stimolazione in cellule nervose di calamaro.

L'immagine proposta ci permette di trarre delle conclusioni sul meccanismo di risposta cellulare che possono essere facilmente generalizzate a qualsiasi cellula. Una di queste riguarda il comportamento della membrana cellulare al tipo di stimolazione che riceve. Infatti si osserva che una forte iperpolarizzazione fino a potenziali di -130 mV comporta solo una bassa corrente entrante come visibile nella prima curva, che si traduce in una modesta permeabilità della membrana ai potenziali negativi, mentre, in generale, le depolarizzazioni provocano importanti correnti ioniche (curve da 2 a 6), mostrando una asimmetria nella permeabilità della membrana plasmatica.

Inoltre a parità di stimolo la permeabilità cambia nel tempo confermando l'esistenza di cinetiche di attivazione dei canali ionici tempo dipendenti. Infine poiché durante i vari step di depolarizzazione l'entità delle correnti entranti e uscenti cambia in modo considerevole anche l'ipotesi della compartecipazione di più tipi di canali ionici alla corrente totale è verificata (curve da 2 a 4).

Un'altra importante osservazione risiede nel fatto che esistono valori particolari del potenziale di stimolazione per cui la corrente entrante si annulla, come nella curva 5. Questo tipo di misure permette di verificare sperimentalmente il valore teorico atteso dalla formula di Nernst per il potenziale di equilibrio di una specie ionica. Infatti, poiché per tali potenziali si ha, per definizione, un gradiente elettrochimico nullo, anche la corrente ionica corrispondente sarà nulla, anzi per potenziali maggiori del potenziale di equilibrio si avrà l'inversione della corrente che diventerà uscente, come dimostra la curva 6, da cui la definizione di *potenziale di inversione*. In effetti per questo tipo di cellule nervose a cui si fa riferimento il potenziale di inversione del  $Na^+$  corrisponde a circa +35 mV.

Di conseguenza in relazione agli obiettivi di un esperimento, si dovrà tenere in considerazione la sovrapposizione parziale nel tempo di queste correnti opposte ed eventualmente per poterne determinare il rispettivo andamento temporale procedere selettivamente con applicazioni farmacologiche. In *Figura 2.4* è riportato un esempio che chiarisce l'applicazione di soluzioni bloccanti in un esperimento di voltage clamp.

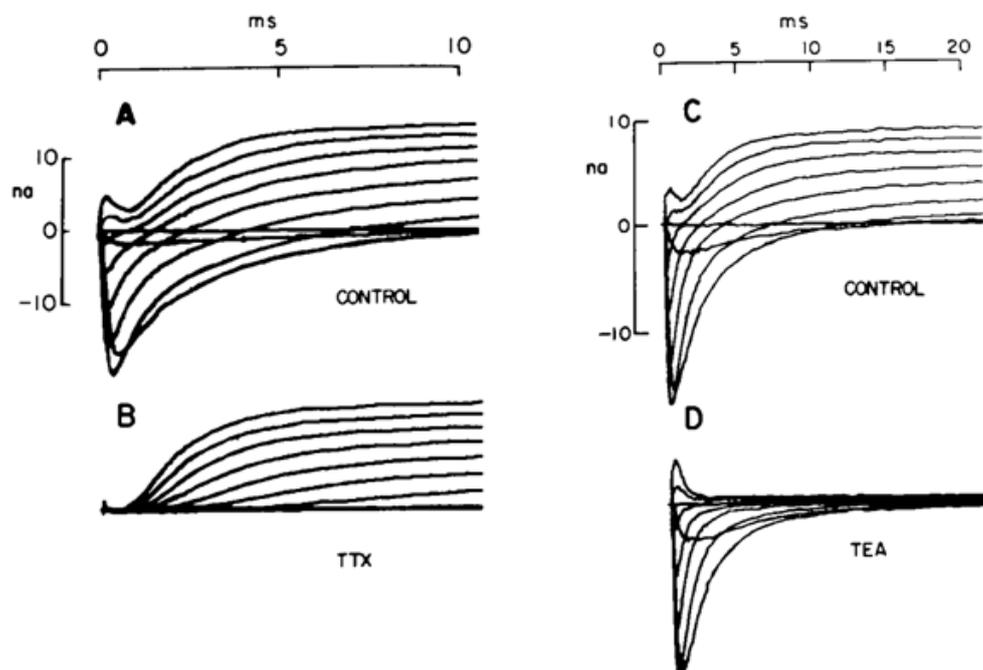


Figura 2.4: Esempio di effetti sulla sull'ampiezza della corrente registrata di trattamenti farmacologici per corrente  $Na^+$  e  $K^+$  in cellule nervose di calamaro.

Le tracce di controllo A e C mostrano le normali correnti ioniche che attraversano la membrana di una fibra nervosa in risposta a 11 diversi stimoli depolarizzanti. A conferma di quanto già anticipato la corrente ha una componente sodio entrante e una componente potassio uscente per la maggior parte degli step del protocollo di stimolazione. Dopo esposizione a 100 nM di tetrodotossina (TTX), la corrente sodio scompare mentre la corrente potassio rimane praticamente inalterata (traccia B) [16]. Viceversa, dopo infusione di TEA 8 mM, la corrente sodio rimane inalterata mentre la corrente potassio scompare (traccia D) [17]. Inoltre i diversi tracciati ottenuti con applicazione di TEA, mostrano chiaramente l'inversione della corrente sodio per depolarizzazioni maggiori del rispettivo potenziale di inversione (circa +35 mV).

### 2.2.1 Metodi di misura

In generale ci sono quattro diversi metodi di misura per poter eseguire un esperimento di patch clamp [18]:

- Cell attached
- Whole cell
- Outside-out
- Inside-out

Ponendo una micropipetta con apertura di 1  $\mu\text{m}$  a contatto con la membrana cellulare si forma un sigillo con una resistenza elettrica di circa 50 M $\Omega$ . Come vedremo nel seguito sebbene questa impedenza é abbastanza alta non é sufficiente a bloccare le eventuali correnti di dispersione che generano il rumore di fondo. Se a questo punto viene applicata una depressione alla micropipetta, il sigillo puó essere migliorato di un fattore 100 o 1000 e si puó raggiungere una resistenza di 10-100 G $\Omega$ , detta Gigaseal, riducendo le correnti di dispersione. Questo rappresenta lo step iniziale da cui si puó procedere con le quattro configurazioni illustrate in *Figura 2.5*.

Nella configurazione cell attached la depressione necessaria per formare il sigillo é esercitata per un breve periodo di tempo, in modo da eliminare tutte le correnti tranne quelle che passano attraverso l'area della membrana selezionata. Di conseguenza lo scambio di ioni tra l'interno della micropipetta e l'esterno puó avvenire solo attraverso i canali ionici presenti in quella parte di membrana. Poiché nel caso di ridotte dimensioni i canali che possono trovarsi nella regione di membrana sotto osservazione sono esigui, questo approccio offre il vantaggio di poter monitorare in modo molto accurato la corrente che passa attraverso di essi, al limite anche la corrente dovuta all'apertura di un solo canale ionico.

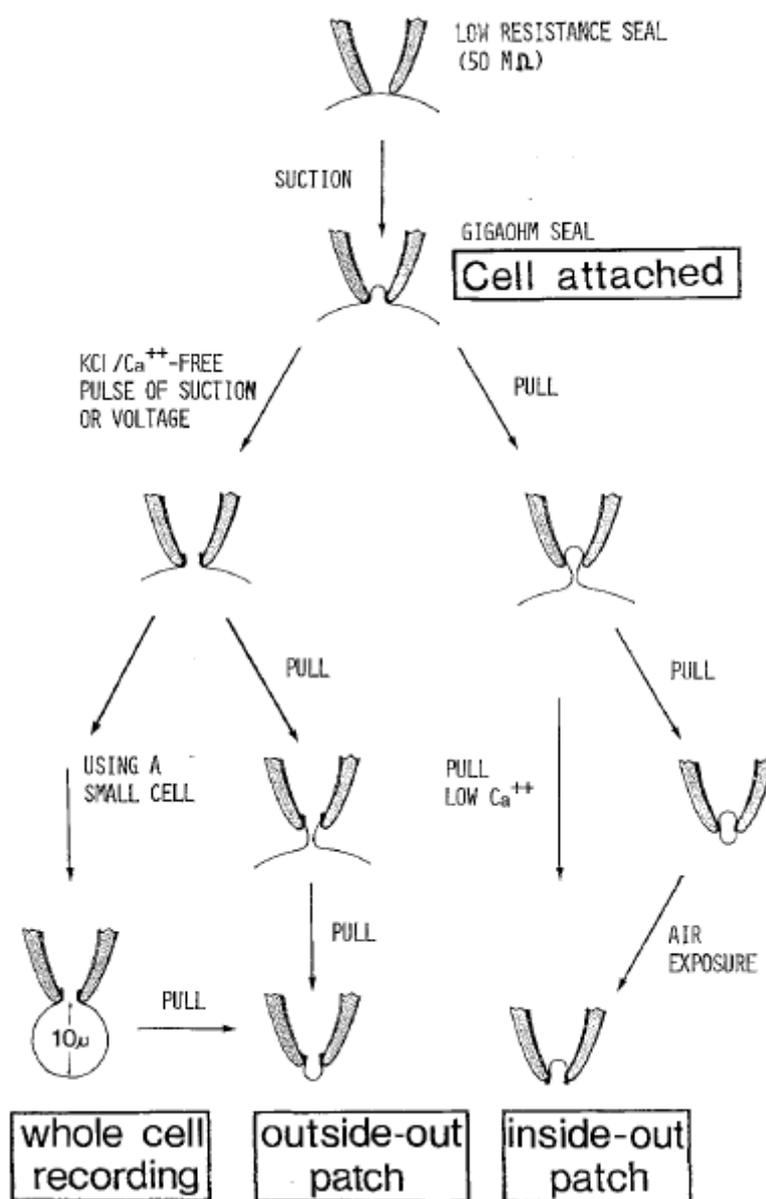


Figura 2.5: Rappresentazione schematica delle diverse configurazioni di registrazione.

Partendo dalla configurazione cell attached e facendo attenzione a non danneggiare il sigillo é possibile rompere la membrana cellulare attraverso un'ulteriore breve aspirazione e registrare, in questo modo, in configurazione whole cell, che rappresenta tra l'altro il metodo piú utilizzato. La micropipetta risulta essere direttamente in collegamento elettrico con l'ambiente interno della cellula permettendo contemporaneamente di mantenere il Gigaseal ed escludere cosí le correnti di leakage. In questo modo si é in grado di misurare la corrente ionica dovuta ai canali dell'intera cellula; questa tecnica é particolarmente indicata per cellule di piccola dimensione con un diametro di 5-20  $\mu\text{m}$ , per le quali permette di ottenere buone registrazioni dei flussi ionici.

L'approccio outside-out rappresenta una versione ridimensionata della tecnica whole cell. In questo metodo dopo la rottura della membrana cellulare la micropipetta viene progressivamente allontanata dalla superficie della cellula; durante questo processo si viene a creare un ponte citoplasmatico circondato da una porzione di membrana cellulare, fino al punto in cui il filamento collassa e si forma una cellula intatta circondata da un piccolo frammento di membrana, che viene isolato e fissato all'estremità della micropipetta. Con questo metodo l'esterno della membrana cellulare può essere esposto a diverse soluzioni; Pertanto, esso può essere usato per studiare il comportamento di singoli canali ionici attivati da recettori extracellulari.

Anche il metodo inside-out parte dalla configurazione cell attached ma invece di procedere con la rottura della membrana, la micropipetta viene allontanata lentamente dalla cellula come nel caso precedente dell' outside-out e dopo il collasso del sottile filamento di citoplasma si forma una struttura chiusa all'interno della pipetta. Questa vescicola non è adatta per misure elettriche, di conseguenza la parte della membrana che si trova all'esterno della pipetta viene rotta con una breve esposizione all'aria, in seguito alla quale il lato citoplasmatico della membrana diventa aperto verso l'esterno, rappresenta sostanzialmente la situazione complementare del metodo outside-out. L'inside-out può anche essere ottenuto direttamente senza l'esposizione all'aria se il processo di stiramento viene effettuato in una soluzione contenente ioni  $Ca^{2+}$ . Con questa configurazione, modificando le concentrazioni ioniche della soluzione in cui le cellule sono immerse, si può esaminare l'effetto di un rapido cambiamento nella concentrazione sul lato citoplasmatico della membrana. Può quindi essere utilizzata per studiare la regolazione citoplasmatica dei canali ionici.

Tra questi diversi approcci risulta ovvio come la formazione di un outside-out o inside-out comporta sicuramente maggiori riarrangiamenti strutturali della membrana. In alcuni casi sono stati esaminati gli effetti di isolamento sulle proprietà del canale, ed è sorprendente come questi artefatti di preparazione risultano pressoché secondari per la maggior parte dei tipi di canali ionici delle membrane cellulari.

### 2.2.2 Limiti teorici di risoluzione

Uno dei vantaggi di lavorare in condizioni di “*Giga seal*” é la possibilità di migliorare la risoluzione della registrazione della corrente di circa un ordine di grandezza [18]. La risoluzione é limitata dal rumore di fondo dovuto alla membrana, alla pipetta e alle apparecchiature elettroniche. Tralasciando quest’ultimo contributo possiamo osservare che una fonte importante di rumore deriva sia dalla porzione della membrana cellulare dove si realizza il sigillo, sia, come accennato in precedenza, dal flusso di cariche tra membrana e pipetta.

Nel primo caso si parla di “*johnson noise*”, o rumore termico, e consiste in una corrente unilaterale di densità spettrale:

$$S_I(f) = 4kT \operatorname{Re}[Y(f)] \quad (2.1)$$

dove  $4kT = 1.6 * 10^{-20}$  Joule a temperatura ambiente, e  $\operatorname{Re}[Y(f)]$  é la parte reale dell’ammettenza, definita come l’inverso dell’impedenza, che dipende in generale dalla frequenza  $f$ . Nel caso della modellizzazione della membrana cellulare secondo lo schema R-C in parallelo si ha  $\operatorname{Re}[Y(f)] = 1/R$ , che sostituita nell’equazione 2.1 e integrando sul range delle frequenze di interesse restituisce la varianza del rumore, che diminuisce in modo inversamente proporzionale alla resistenza del patch. A partire dalla varianza é possibile determinare l’entità del piú piccolo impulso di corrente misurabile e realizzare grafici in funzione della durata dell’impulso e al variare del parametro R, come quello mostrato in *Figura 2.6* tratto dalla letteratura.

Mentre le linee continue del grafico mostrano i limiti teorici calcolati con l’equazione 2.1, la linea tratteggiata riporta una valutazione del rumore nel caso di un esperimento reale con resistenza del sigillo di 50 M $\Omega$ . Come si puó osservare, sebbene nella realtà gli impulsi piú piccoli che possono essere misurati hanno un’ampiezza maggiore del caso teorico, in generale esiste un buon accordo negli ordini di grandezza attesi e con l’andamento della curva.

L’altra fonte del rumore di fondo é il cosiddetto “*shot noise*” che deriva dal naturale passaggio di ioni attraverso la membrana, sia passivamente che con trasporto attivo, necessario per il mantenimento del potenziale di riposo della cellula. Sebbene la dimensione e lo spettro di questo rumore dipenda dai dettagli del processo di traslocazione degli ioni, una stima approssimativa della densità spettrale puó essere svolta presupponendo che uno ione attraversi rapidamente la membrana cellulare, possiamo quindi scrivere:

$$S_I = 2IQ \quad (2.2)$$

dove Q é la carica effettiva del portatore, che puó corrispondere anche ad un multiplo della carica unitaria, e I é la corrente unidirezionale. Questo tipo di rumore per  $I = 0.5$  pA é quasi lo stesso del rumore Johnson con  $R = 100$  G $\Omega$ , infatti in generale se R é

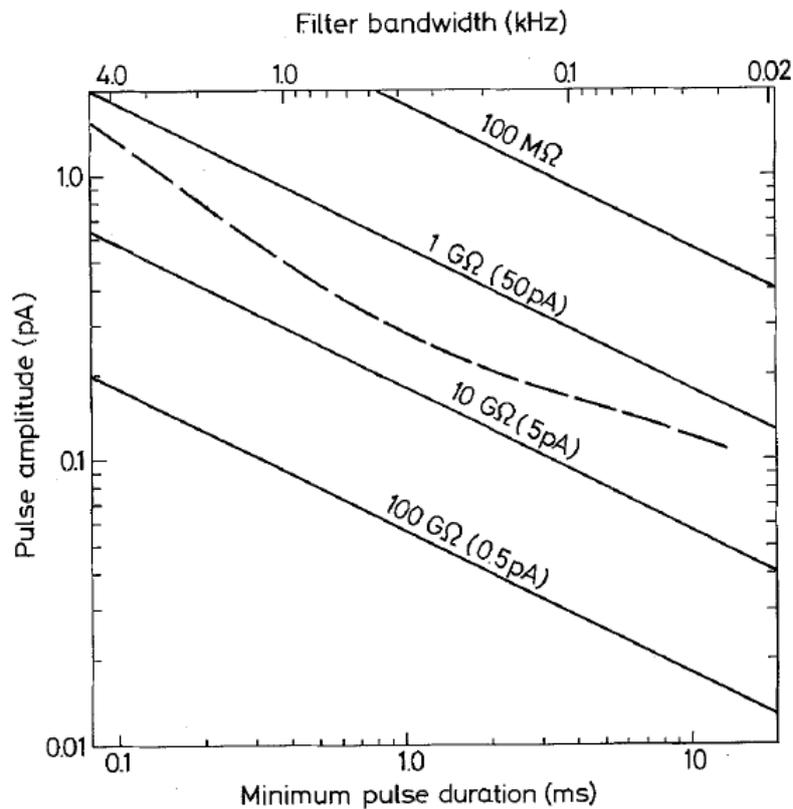


Figura 2.6: Limite dell'impulso misurato dovuto al rumore di fondo.

determinata principalmente dai canali di leakage presenti nella porzione di membrana in cui avviene il sigillo, lo shot noise può essere paragonabile al rumore Johnson.

Anche la presenza della pipetta comporta la comparsa di una serie di contributi al rumore di fondo. Quello potenzialmente più significativo è dovuto ad un sottile strato di soluzione che si dispone sulla superficie esterna della micropipetta. L'esistenza di questa pellicola si può osservare grazie all'applicazione di un piccolo gradino di tensione, in seguito al quale si manifesta un transiente capacitivo la cui costante di tempo è influenzata dalle correnti d'aria vicino alla pipetta. Qualora l'entità di questo rumore sia considerevole è possibile ridimensionarlo grazie all'applicazione sulla superficie della cannula di un rivestimento di una soluzione idrofobica che previene la formazione della pellicola.

## 2.3 Descrizione dell'apparato sperimentale

In questa sezione verranno descritte le apparecchiature utilizzate per praticare la tecnica del voltage clamp. Poiché si tratta sostanzialmente di attrezzature di base si é preferito presentarle in questo contesto; nei prossimi capitoli verranno fornite altre informazioni riguardo il loro utilizzo.

L'apparato strumentale presente in laboratorio consiste nelle seguenti parti:

- microscopio ottico posizionato su tavolo antivibrante;
- sistema di amplificazione e convertitore tensione-corrente;
- micro e macromanipolatori;
- sistema di perfusione;
- schermo elettrostatico;
- software di controllo e acquisizione dati;
- puller e microscopio microforgia;
- incubatore e cappa biologica.

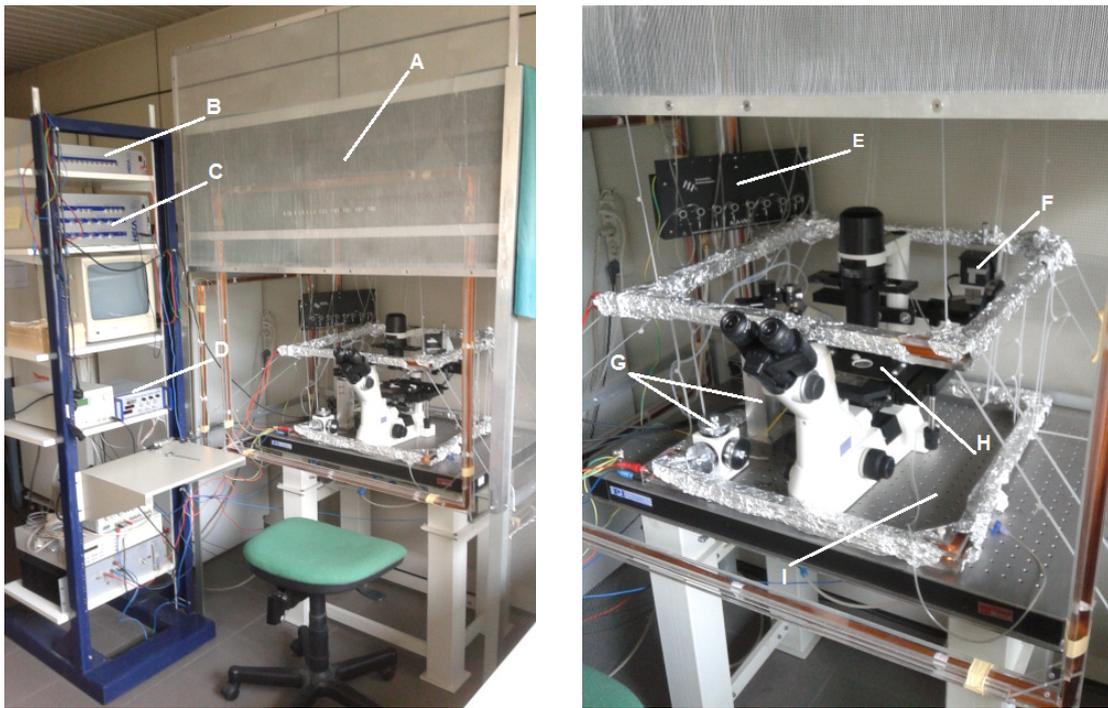
Il microscopio ottico é un modello trinoculare della Nikon (Eclipse TS100) a movimento verticale ed invertito, ossia gli obiettivi si trovano al di sotto del piano di lavoro sul quale vengono posizionate le petri, che é posto ad una altezza di circa 20 mm, consentendo una maggiore libertá di utilizzo. La presenza del terzo oculare permette l'applicazione di specifiche telecamere per la ripresa on-line degli esperimenti. L'angolo di visione é inclinato a 45° e l'altezza degli oculari dal piano di appoggio é regolata a 400 mm per consentire una facile visualizzazione sia in posizione seduta che in piedi.

Il microscopio é posizionato su un banco ottico antivibrante della Physik Instrumente con larghezza di 90 cm, profonditá di 60 cm e fori ogni 2 cm, che permettono il fissaggio di eventuali accessori. All'interno del tavolo sono presenti compartimenti che possono essere pressurizzati riempiendoli d'aria, isolando il piano di lavoro da possibili disturbi dovuti ad onde meccaniche a bassa frequenza.

Sul banco ottico é presente anche il dispositivo della perfusione dotato di 8 sostegni per posizionare i contenitori delle soluzioni farmacologiche, con relative valvole di flusso controllate tramite il software. Per poter dirigere la cannula della perfusione all'interno della petri e in prossimitá della cellula che si vuole registrare sono necessari un macro e un micromanipolatore con possibilitá di movimento nelle tre dimensioni dello spazio.

Tutte queste apparecchiature sono contenute all'interno di una gabbia metallica necessaria per schermare eventuali campi elettrostatici. L'apparato di patch clamp é

circondato da un sistema di bobine quadrangolari costituito da tre coppie di avvolgimenti ortogonali e indipendenti tra loro. Facendo scorrere nelle bobine opportune combinazioni di corrente continua (DC) e corrente alternata (AC) a bassa frequenza é possibile studiare le interazioni di risonanza per specifici ioni e le eventuali variazioni nella corrente di canale [19]; inoltre questo sistema é in grado di schermare l'area di misura da eventuali campi magnetici locali presenti all'interno del laboratorio. In *Figura 2.7* sono illustrati alcuni degli elementi del setup sperimentale di cui abbiamo parlato.

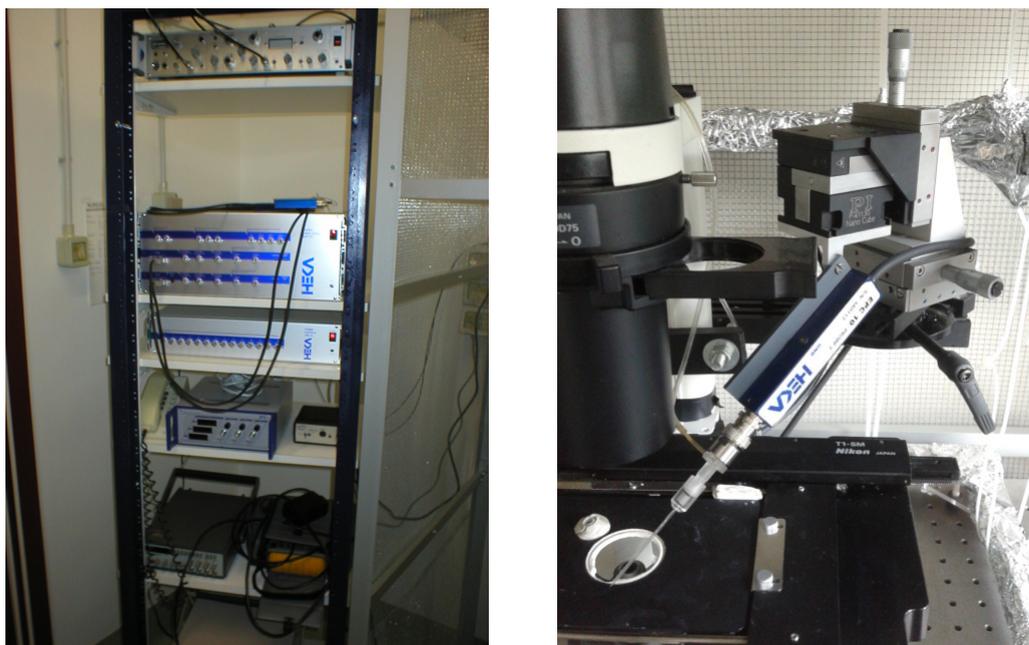


(a) Setup sperimentale.

(b) Dettaglio del banco ottico.

Figura 2.7: Apparecchiature per patch clamp. (a) A: gabbia di faraday; B: controllo perfusione; C: amplificatore; D: controllo piezoelettrico elettrodo. (b) E: sostegno per perfusione; F: manipolatore elettrodo; G: micro e macromanipolare cannula perfusione; H: piano di lavoro del microscopio; I: banco ottico.

L'amplificazione del segnale é affidata ad uno strumento della HEKA Instruments (EPC-10) interfacciato con il software Patch Master tramite il quale si ha il pieno controllo manuale dell'amplificatore e del dispositivo di perfusione. L'elettrodo di misura é a diretto contatto con il preamplificatore, il quale é alloggiato su un manipolatore; questo sistema di guide ad assi ortogonali permette di eseguire sia grandi spostamenti dell'elettrodo agendo manualmente, necessari nelle operazioni di sostituzione della pipetta e nell'osservazione delle cellule, oppure micromovimenti tramite un controllo piezoelettrico. Queste attrezzature sono mostrate in *Figura 2.8*.



(a) Sistema di amplificazione.

(b) Preamplificatore e manipolatore.

Figura 2.8: Dettaglio di alcune apparecchiature per patch clamp.

Un altro gruppo di attrezzature molto importante riguarda la lavorazione delle micropipette. Infatti, come approfondiremo nel seguito, queste vengono prodotte a partire da capillari di materiale vetroso che vengono forgiati e sottoposti a trattamento termico per eliminare piccoli difetti. Gli strumenti necessari per queste operazioni sono il Puller e la Microforgia, che sono mostrati nella *Figura 2.9*.

Il Puller presente in laboratorio è un modello della Sutter Instrument CO. (P-97), offre un buon controllo del processo di forgiatura e un alto grado di riproducibilità delle caratteristiche delle micropipette che si ottengono. Il sistema di controllo è costituito da un microprocessore che può essere programmato, inserendo i parametri desiderati, e rende la procedura praticamente automatica.

La microforgia è costituita da un microscopio sul quale è applicato un sistema che permette di portare la punta della micropipetta, precedentemente creata con il Puller, in prossimità di un filamento di platino che può essere scaldato; in questo modo è possibile ripulire la punta da eventuali imperfezioni o polvere. Il modello utilizzato (MF-830) è della Narishige ed è equipaggiato con una coppia di obiettivi, uno da 10 ingrandimenti (10x) e l'altro da 40 (40x), e un manipolatore a tre dimensioni su cui bloccare la pipetta.

Poiché si tratta di una tecnica che prevede l'utilizzo e il trattamento di materiale biologico, nel nostro laboratorio sono presenti anche un incubatore, per mantenere le cellule in coltura, e una cappa biologica, che crea un flusso d'aria laminare e permette di lavorare in ambiente protetto preservando la sterilità dei terreni di coltura e delle soluzioni preparate (*Figura 2.10*).



(a) Puller.



(b) Microforgia.

Figura 2.9: Apparecchiature per preparazione delle micropipette.



Figura 2.10: Attrezzature per preparati biologici.

# Capitolo 3

## PEDOT:PSS come dispositivo bioelettronico

Questo capitolo é dedicato alla descrizione delle proprietà del polimero PEDOT:PSS poli(etilenediossitiolfene)poli(stirenesulfonato) utilizzato in questo lavoro di tesi, ed ha lo scopo di fornire le informazioni generali necessarie per affrontare la successiva parte sperimentale.

### 3.1 Generalità sul PEDOT

I polimeri a base di tiofene si dimostrano relativamente stabili rispetto ad altri polimeri conduttori, ma hanno lo svantaggio di manifestare una diminuzione di conducibilità elettrica su lunghi periodi, limitando notevolmente le applicazioni industriali.

La stabilità del politiofene può essere migliorata diminuendo il suo potenziale di ossidazione, introducendo all'interno della catena polimerica dei gruppi elettron-donatori come ad esempio il gruppo etere. Tali composti possono essere polimerizzati tramite elettrodeposizione ad un potenziale notevolmente inferiore rispetto al tiofene, e i polimeri risultanti sono più stabili nello stato di anione-dopato, specialmente quando la catena non é troppo lunga.

Sulla base di queste considerazioni nella seconda metà degli anni '80 nasce il poli(3,4-etilenediossitiolfene) (PEDOT) [20], un polimero coniugato conduttore composto da una catena di monomeri di 3,4-etilenediossitiolfene (EDOT), come mostrato in *Figura 3.1*, che nel corso degli anni ha ricevuto un interesse sempre maggiore da parte degli scienziati.

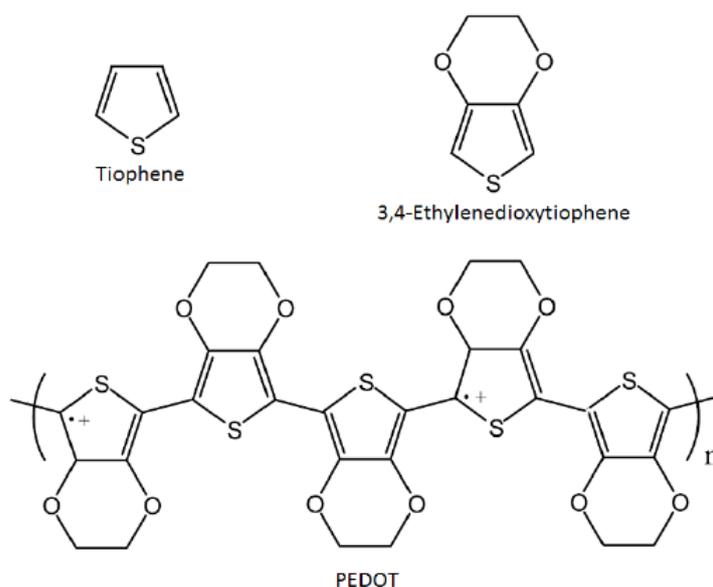


Figura 3.1: Struttura chimica del PEDOT.

Il motivo di tale successo é dovuto alle sue notevoli proprietà [21], che vogliamo riassumere nei diversi punti che seguono:

**Stato di drogaggio reversibile** Il PEDOT può essere ripetutamente drogato e non drogato. Nello stato ossidato presenta una colorazione quasi trasparente con tonalità nell'azzurro, che può essere facilmente modificata rendendola più scura e opaca nello stato neutro. Così il suo colore cambia visibilmente quando cambia il suo stato di drogaggio e questo fenomeno può essere sfruttato per applicazioni ottiche, come i display elettrochimici.

**Eccellente stabilità** Questo materiale presenta una notevole stabilità chimica e termica. Studi termici dimostrano che sopra i 150°C si presenta una degradazione costante, mentre superati i 390°C si assiste ad una completa decomposizione. Le proprietà elettriche di conduzione sembrano rimanere sostanzialmente inalterate durante il processo di invecchiamento in condizioni ambientali. La grande stabilità é attribuita alla struttura geometrica favorevole ad anello e all'effetto elettron-donatore degli atomi di ossigeno nelle posizioni 3- e 4- che stabilizzano la carica positiva nella catena polimerica.

**Struttura regolare** A causa della struttura del monomero non si presentano competizioni nella polimerizzazione nelle posizioni 3- e 4- come nel caso del tiofene, pertanto sono previsti solo gli accoppiamenti 2,5- del 3,4-etilenediossitiufene. Di conseguenza rispetto ad altri polimeri in cui é presente il tiofene il PEDOT dovrebbe mostrare meno difetti.

**Basso band-gap** Il band-gap del PEDOT é di circa 1.5-1.6 eV. Si crede che questo valore, minore rispetto al politiofene, derivi dall'influenza dei gruppi elettron-donatori di etilenediossi- sulle energie dei livelli di frontiera dei sistemi  $\pi$ . I risultati sperimentali mostrano che dopo il drogaggio il PEDOT manifesta un ridotto assorbimento nel visibile, infatti l'energia del moto vibrazionale si riduce da 1.5 eV, corrispondente alla piú bassa transizione  $\pi$ - $\pi^*$ , a piú di 1 eV nello stato metallico. Questo comportamento porta ad un'elevata conducibilitá elettrica nello stato drogato che puó superare i 550 S/cm.

**Proprietá elettrochimiche** Paragonato ad altri polimeri conduttivi, i film di PEDOT sintetizzati elettrochimicamente hanno un basso potenziale redox ed una eccellente stabilitá nello stato drogato. Attraverso studi di voltammetria ciclica é stato scoperto che i picchi redox, considerati a partire da circa 0 mV nel caso di ossidazione e -400 mV per la riduzione, rimangono sostanzialmente inalterati durante il ciclo. Tuttavia solo con l'applicazione di un potenziale negativo di -700 mV i film neutri sono risultati essere stabili. Inoltre misurazioni di potenziale a circuito aperto mostrano che i film neutri vengono ossidati rapidamente.

## 3.2 Struttura del PEDOT:PSS

La catena policationica del PEDOT non é solubile in nessun solvente, ma usato in combinazione con altri polimeri, come il poli(stirenesulfonato) (PSS) nel ruolo di contro-ione, permette di ottenere un complesso polielettrolita (PEC) caratterizzato da una dispersione stabile, che é riproducibile su scala industriale e puó essere utilizzato in molte tecniche di deposizione [22]. Il polimero organico che ne deriva, il PEDOT:PSS, risulta un materiale composito, ben strutturato e duraturo, ottenuto dall'interazione elettrostatica tra due macromolecole cariche che porta alla formazione di un legame di tipo ionico. I responsabili di tali interazioni sono alcuni gruppi sulfonilici presenti nel polistirene sulfonato, che, essendo deprotonati, assumono una carica netta negativa e vengono attratti dalle cariche positive trasportate dal PEDOT; in *Figura 3.2* é riportata la struttura chimica del PEDOT:PSS e i siti di interazione tra i costituenti di base.

Il PSS é stato il primo polielettrolita utilizzato per realizzare un PEC con il PEDOT nel 1990 ed é rimasto il polimero maggiormente utilizzato per questo tipo di composti. Il PSS é disponibile in commercio in una grande varietá di pesi molecolari con differenti polidispersivitá e in seguito alla sua solubilitá in acqua puó essere facilmente lavorato in film, che si presentano durezza e privi di assorbimento nel campo del visibile.

Il PSS, come contro-ione del PEDOT, viene sempre utilizzato in eccesso. In dispersioni standard di PEDOT:PSS il rapporto molare tra i gruppi di tiofene e i gruppi di acido sulfonico é sempre minore di uno e va da un minimo di 1:1.9 a un massimo di 1:15.2,

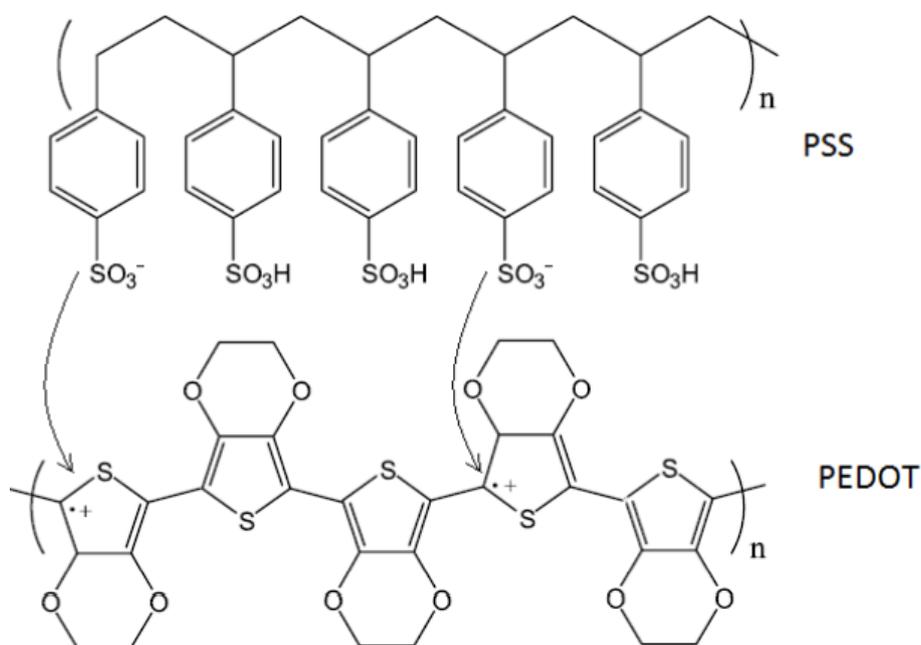


Figura 3.2: Struttura chimica del PEDOT:PSS.

che corrispondono rispettivamente ad un rapporto in peso di 1:2.5 e 1:20. Inoltre dal momento che é presente una sola carica per ogni tre o quattro anelli di tiofene, l'eccesso di carica sul PSS é compreso tra le 6 e le 46 volte. A causa della delocalizzazione delle cariche positive nel PEDOT, dei risultanti gruppi polari debolmente interagenti e della differente spaziatura delle cariche nel PEDOT rispetto al PSS, é ragionevole assumere che la struttura del PEDOT:PSS sia dovuta a interazioni casuali tra le loro rispettive catene polimeriche, senza un particolare ordine a livello molecolare o supermolecolare, formando il cosiddetto aggregato “*scrambled-egg*”.

Poiché, come anticipato, il policatione PEDOT non é solubile in alcun solvente, la sua sintesi ha bisogno di avvenire in presenza di PSS in modo che il complesso PEC é formato *in situ* mano a mano che la catena policationica si accresce. Questo requisito costituisce una forte limitazione per l'analisi del PEDOT dal momento che una catena cationica di PEDOT puó essere ottenuta solamente in combinazione con un polianione adatto. Per facilitare e rendere economico il processo di sintesi del PEDOT:PSS il solvente preferito é l'acqua. La dimensione delle particelle della dispersione di PEDOT:PSS puó essere rilevata mediante ultra-centrifugazione. Queste analisi mostrano una dimensione media delle particelle compresa nell'intervallo che va da 10 nm a 1  $\mu$ m, con una distribuzione granulometrica tipicamente non-Gaussiana.

### 3.3 Proprietá dei film di PEDOT:PSS

I film realizzati con il PEDOT:PSS possiedono molte proprietá interessanti che verranno descritte nelle pagine che seguono.

#### 3.3.1 Resistenza al calore ed esposizione alla luce

Una delle proprietá piú importanti é rappresentata da una buona stabilitá termica. In *Figura 3.3* é riportato l'andamento della perdita di peso di un campione sottoposto ad un rate di riscaldamento costante in funzione della temperatura e in atmosfera di elio. Si osserva che fino ai 100°C la perdita di peso é determinata solamente dall'evaporazione dell'acqua residua; superati i 250°C il peso del campione diminuisce in modo significativo, la ragione di ciò é da imputare alla progressiva frammentazione dei gruppi di PSS. Un'ulteriore perdita di peso del campione, sebbene di entitá minore rispetto alla precedente, si presenta superati i 350°C ed é dovuta ad altre frammentazioni originate dall'ossidazione del carbonio. Quindi in generale il materiale viene considerato sostanzialmente stabile fino ai 200°C.

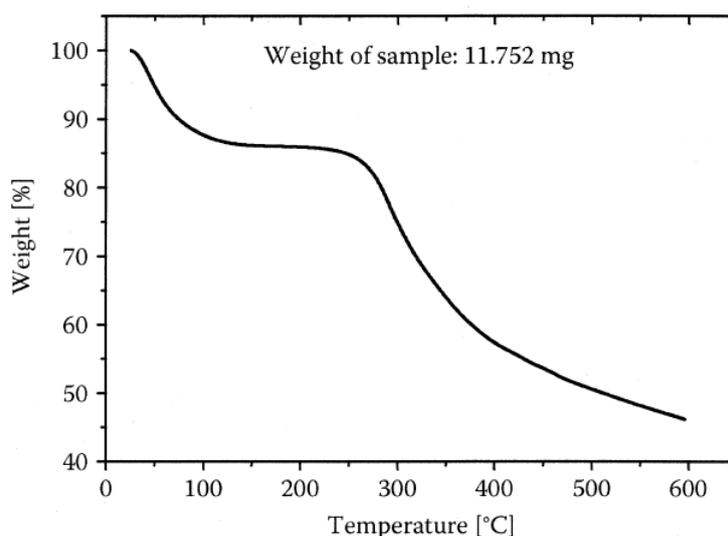


Figura 3.3: Perdita di peso di un campione di PEDOT:PSS con rapporto di peso di 1:20 al variare della temperatura.

Quando i film di PEDOT:PSS sono esposti alla luce, le lunghezze d'onda della radiazione influiscono sulla cinetica di degradazione del materiale in modo significativo. Nello specifico la conducibilitá dei film diminuisce considerevolmente in seguito all'assorbimento di fotoni nella regione UV dello spettro elettromagnetico con lunghezza d'onda  $\lambda < 320$  nm; questo comportamento si verifica anche in molti altri polimeri ed implica una degradazione del PEDOT:PSS tanto maggiore quanto piú tempo si lascia esposto alla radiazione UV. Questo fatto deve essere preso in considerazione quando si rende necessario

l'utilizzo in ambiente non controllato, come ad esempio in applicazioni all'aperto; infatti, oltre alla luce UV, anche la semplice esposizione all'aria provoca un aumento di resistività. Questi risultati dimostrano che la degradazione é dovuta ad un processo di ossidazione del PEDOT indotto dall'aria e accelerato dall'assorbimento simultaneo della radiazione UV. Una soluzione soddisfacente per rimediare a tali problemi consiste nel ricoprire i film con un sottile strato di vetro o con polimeri protettivi.

### 3.3.2 Affinitá con l'acqua

Il PEDOT: PSS é un materiale fortemente igroscopico e in virtú di ciò tende ad assorbire l'umidità dell'ambiente in cui si trova. La perdita di peso del 15% in seguito a riscaldamento, come abbiamo illustrato in *Figura 3.3*, puó quindi essere sostanzialmente attribuita ad acqua assorbita. Sottili strati di PEDOT:PSS fino ad uno spessore di circa 100 nm sono in grado di assorbire acqua dall'ambiente quasi istantaneamente, di conseguenza la quantità d'acqua che viene incorporata nei film provoca un aumento considerevole dello spessore. La capacità dei film di incamerare acqua dipende sia dal livello di umidità relativa, sia dal rapporto tra PEDOT e PSS. Per film che presentano un elevato contenuto di PSS lo spessore puó essere particolarmente pronunciato, fino ad aumentare anche del 30%.

### 3.3.3 Proprietá meccaniche e morfologia

Uno dei vantaggi maggiori dei film di PEDOT:PSS rispetto ai materiali inorganici é la loro resistenza alla flessione, questa flessibilità, unita alla trasparenza e alla conducibilità elettrica risulta molto utile, ad esempio, quando si rende necessario l'uso del PEDOT:PSS per il rivestimento di altri polimeri. Le proprietá meccaniche sono state studiate mediante test di resistenza alla trazione. Tutte le caratteristiche meccaniche risultano essere fortemente dipendenti dal livello di umidità relativa (rH) [23]. Questa dipendenza puó essere vista in *Figura 3.4*, che mostra tipiche curve sforzo-deformazione ottenute in condizioni differenti, mentre una panoramica dei risultati é sintetizzata in *Tabella 3.1*

La morfologia del PEDOT:PSS é stata analizzata con diverse tecniche. Secondo il modello accettato in letteratura i film di PEDOT:PSS sono costituiti da grani con diametro medio di circa 30-40 nm, composti da un nucleo ricco di PEDOT e ricoperti da un guscio di PSS. La coerenza del materiale é ottenuta tramite i legami a idrogeno formati tra le molecole di PSS presenti nel guscio di rivestimento. In condizioni di scarsa umidità questi legami a idrogeno sono molto forti e quindi le crepe poste in prossimitá di eventuali fratture si espandono attraverso i singoli granelli, provocando una frattura transgranulare, ciò porta macroscopicamente a frattura di tipo fragile con superfici nette. Un'umidità piú elevata porta all'assorbimento d'acqua da parte del guscio di PSS, idrofilo e igroscopico, e quindi, come anticipato, ad un rigonfiamento del materiale, che aumenta

le distanze relative tra i grani. Distanze maggiori tra i gusci di PSS si traducono in una ridotta coesione a causa dell'indebolimento dei legami a idrogeno e quindi in una ridotta resistenza meccanica agli sforzi. In questa circostanza al momento della trazione i singoli grani possono slittare tra loro. Questo porta ad una frattura intergranulare con una superficie scabra, che può dar vita macroscopicamente a fratture di tipo plastico.

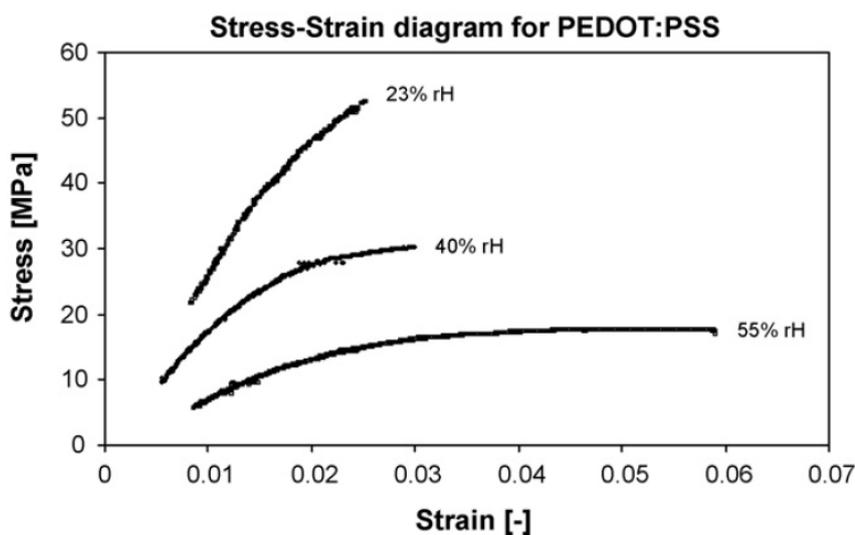


Figura 3.4: Curve sforzo-deformazione ottenute in diverse condizioni di umidità.

Umidità relativa	Resistenza alla trazione	Modulo di Young	Comportamento a frattura
23%	53.2 MPa	2.8 GPa	Fragile
40%	33.7 MPa	1.9 GPa	Intermedio
55%	22.2 MPa	0.9 GPa	Plastico

Tabella 3.1: Proprietá meccaniche di un campione di PEDOT:PSS spesso  $25 \mu\text{m}$  sottoposto a trazione.

### 3.3.4 Spettro di assorbimento

Lo spettro di assorbimento del PEDOT:PSS é quasi identico a quello del PEDOT polimerizzato chimicamente *in situ* senza PSS. I film sottili di PEDOT:PSS sono fortemente trasparenti nel campo spettrale del visibile, con curve di trasmissione sostanzialmente piatte o al piú leggermente decrescenti a causa del maggiore assorbimento nel rosso, che dona ai film un'apparenza d'azzurro. Nella *Figura 3.5* sono mostrati i dati di trasmissione della luce per film di PEDOT:PSS di vario spessore.

Un aspetto interessante é che lo spettro di assorbimento del PEDOT:PSS dipende fortemente dallo stato di ossidazione del PEDOT. La *Figura 3.6* illustra gli spettri di assorbimento per film di PEDOT:PSS depositati su ITO (ossido di indio-stagno), utilizzato come elettrodo, in una cella elettrochimica, in funzione dell'energia del fotone per differenti valori di tensione.

Il picco a 2,2 eV (560 nm) si riduce all'aumentare del bias applicato che comporta inoltre la comparsa di due nuovi picchi a energie piú basse. Il polimero ottenuto ad un bias di -1.5 V assorbe fortemente nel visibile, mentre il PEDOT nella forma ossidata a 0,5 V é quasi trasparente in questa regione. Inoltre i due picchi a 0,5 eV e 1,4 eV che si creano nelle forme ossidate indicano che la carica inserita elettrochimicamente nel polimero porta alla creazione di nuovi stati elettronici.

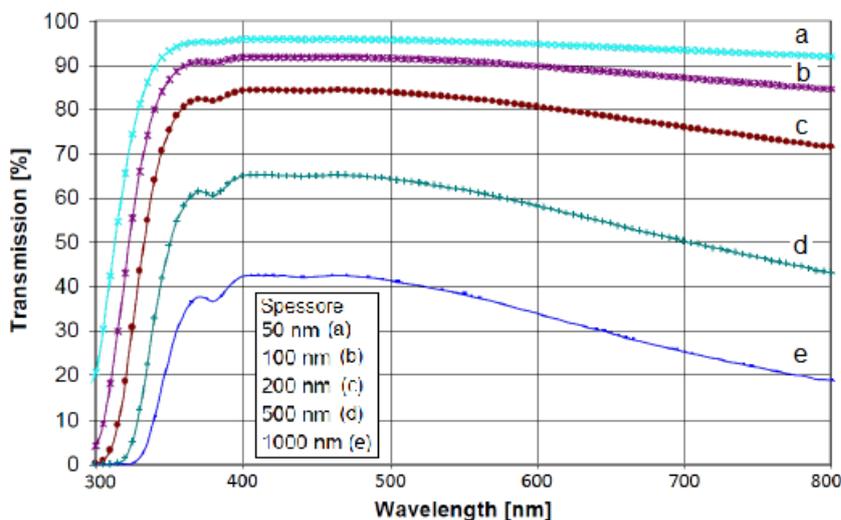


Figura 3.5: Curve di trasmissione della luce nel range UV-Vis per PEDOT:PSS disidratato.

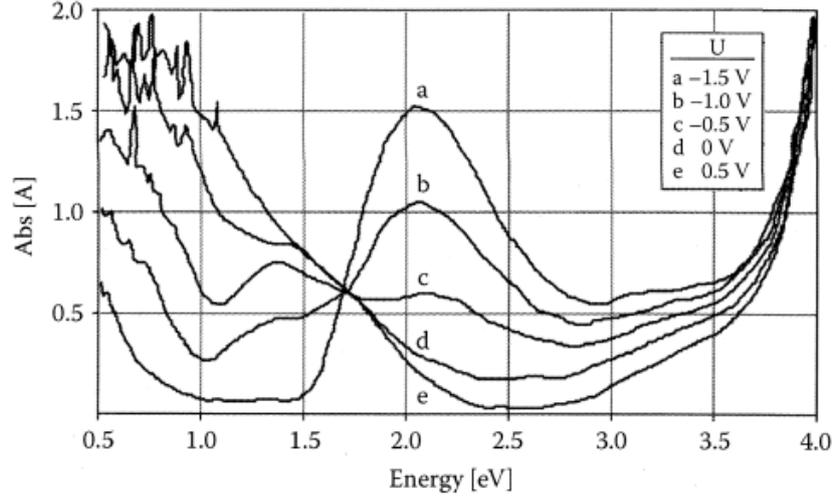


Figura 3.6: Spettro di assorbimento del PEDOT:PSS depositato su un elettrodo di una cella elettrochimica al variare della tensione applicata.

### 3.3.5 Conducibilità elettrica

In generale la conducibilità elettrica  $\sigma$  é definita come il prodotto tra la carica elementare  $e$ , la mobilità dei portatori di carica  $\mu$  e la loro densità  $n$ . Nel caso di sistemi conduttori basati sull'abbondanza relativa di lacune ed elettroni bisogna considerare entrambi questi contributi secondo l'equazione:

$$\sigma = e\mu_p n_p + e\mu_n n_n \quad (3.1)$$

Nel caso del PEDOT:PSS solamente le lacune sono importanti per il trasporto della carica, infatti l'immissione di elettroni liberi comporta immediatamente la loro ricombinazione con i siti ossidati del PEDOT e quindi il trasporto di elettroni non contribuisce alla corrente complessiva. La densità delle lacune nel PEDOT: PSS può essere calcolata utilizzando considerazioni geometriche. Per ottenere aggregati altamente conduttivi il rapporto in peso tra PEDOT e PSS deve essere di circa 1:2.5. La densità dei film solidi é di circa  $1 \text{ g/cm}^3$ . Poiché i pesi molecolari delle unità monomeriche del PEDOT e del PSS sono rispettivamente di  $140 \text{ g/mol}$  e  $182 \text{ g/mol}$ , la densità dei monomeri di EDOT può essere stimata approssimativamente di  $10^{21} \text{ cm}^{-3}$ . Di conseguenza la densità di lacune nei film di PEDOT:PSS può essere stimata essere circa  $n_p = 3 * 10^{20}$ . Per film altamente conduttivi é stata ottenuta una conducibilità elettrica di  $1000 \text{ S/cm}$ . A questo punto la mobilità delle lacune nel PEDOT:PSS può essere stimata approssimativamente pari a circa  $\mu_p = 20 \text{ cm}^2/\text{Vs}$ .

Sperimentalmente le proprietà elettriche di uno strato di PEDOT:PSS sono in genere determinate dal deposito uniforme di film sottili su un substrato conduttivo, uno dopo l'altro fino a raggiungere lo spessore desiderato. La resistenza del singolo strato,  $R_s$ , viene

misurata tramite sonde a due punti e la resistività,  $\rho$ , é calcolata moltiplicando  $R_s$  per lo spessore dello strato  $d$ , secondo l'equazione:

$$\rho = R_s d \quad (3.2)$$

Un altro aspetto importante da tenere in considerazione in particolari condizioni sperimentali é la dipendenza della conducibilitá elettrica del materiale dalla temperatura. In base ad alcuni studi infatti le proprietá conduttive del PEDOT:PSS migliorano all'aumentare della temperatura secondo il seguente modello matematico:

$$\sigma(T) = \sigma_0 \exp \left[ - \left( \frac{T_0}{T} \right)^\gamma \right] \quad (3.3)$$

dove  $\sigma_0$  é la conducibilitá per il limite ad infinito della temperatura,  $K_b T_0$  é la barriera energetica tra gli stati e  $\gamma$  é uguale a  $1/(1 + D)$ , con  $D$  che indica la dimensionalitá del sistema considerato, assumendo che la densitá degli stati vicino al livello di Fermi  $N(E_f)$  é quasi costante o poco dipendente dall'energia.

L'equazione 3.3 prevede con successo l'aumento di conducibilitá elettrica per temperature che variano da  $0K$  a  $300K$ . Inoltre, nella maggior parte delle condizioni sperimentali in cui la conducibilitá non sia molto bassa, i dati sono meglio modellizzati da un esponente pari a  $\gamma = 0.5$ .

Le proprietá di cui abbiamo discusso permettono di realizzare facilmente film di PEDOT:PSS di alta qualitá attraverso processi e tecniche di lavorazione convenzionali, con la possibilitá di estendere le aree di utilizzo scegliendo opportunamente i substrati in relazione ai diversi settori di impiego. In particolare l'eccellente stabilitá termica e l'elevata trasparenza nel campo del visibile, rendono il PEDOT:PSS un candidato molto promettente per varie applicazioni in dispositivi elettronici e di bio-ingegneria come: elettrodi flessibili, display elettrocromici, superconduttori e transistor.

## 3.4 Esempio di applicazione: substrati per colture cellulari

Le prime osservazioni di crescita cellulare su substrati polimerici risalgono al 1994, quando si scoprì che alcune linee cellulari si sviluppavano in modo differente relativamente allo stato di ossido-riduzione del materiale su cui venivano depositate [24].

Il PEDOT drogato, grazie alla migliore conducibilità elettrica e alla buona stabilità nel tempo dello stato ossido-riduttivo, oltre che alla scarsa tossicità per molti tipi cellulari come fibroblasti, cellule epiteliali e neuronali, si rivela un materiale ideale per questo tipo di esperimenti. In particolare dei film di PEDOT:p-toluenesulfonato (TOS) sono stati utilizzati per studiare l'adesione e la proliferazione cellulare in condizioni di substrato ossidato e ridotto [25].

La tecnica alla base di questi esperimenti prevede che il polimero venga polimerizzato direttamente sul fondo di una piastra petri e successivamente collegato elettricamente tramite due elettrodi ad un generatore di tensione per sottoporre il PEDOT:TOS ad una differenza di potenziale di circa 1.5 V; in questo modo in metà della Petri il PEDOT:TOS viene ossidato mentre nell'altra assume la forma ridotta. I risultati hanno mostrato che le cellule depositate sul PEDOT ossidato aumentano il grado di adesione di circa il doppio rispetto al PEDOT ridotto; inoltre in tali dispositivi è possibile favorire o meno l'adesione cellulare dipendentemente dallo stato di ossido-riduzione del substrato, che può essere facilmente invertito data la reversibilità, dal punto di vista elettrico, di questo tipo di esperimenti.

In altre esperienze sono stati utilizzati dispositivi in grado di ricreare un potenziale di ossido-riduzione lineare nel substrato polimerico [26]. Un esempio di questo tipo è riportato in *Figura 3.7* dove viene schematizzato un congegno costituito da uno strato di ITO, depositato su vetro e ricoperto con un sottile film di PEDOT:TOS. Viene inoltre collocato un serbatoio realizzato con polidimetilsilossano (PDMS) per contenere il mezzo di coltura cellulare, che presenta le caratteristiche di una soluzione elettrolitica, e un elettrodo di massa è immerso nel fluido. Successivamente vengono applicati alle estremità opposte della striscia di ITO i potenziali 1.5 V e -1.5 V; in questa configurazione, gli ioni positivi del terreno di coltura entrano nel film di PEDOT-TOS in prossimità dell'estremità polarizzata negativamente; la densità locale di lacune diminuisce in modo da mantenere l'equilibrio di carica e il film è ridotto. In modo simile, l'ossidazione avviene all'estremità polarizzata positivamente, creando un gradiente redox lungo lo strato di PEDOT:TOS. Grazie alle migliori proprietà di conducibilità elettrica dell'ossido di indio-stagno, di almeno 100 volte superiori rispetto al PEDOT:TOS, la variazione di conducibilità associata con l'assorbimento di ioni nel film di PEDOT:TOS provoca un gradiente di potenziale lineare. Dopo la polarizzazione, le cellule vengono seminate nel serbatoio di PDMS in assenza di tensione applicata. Come risultato la densità

cellulare, la loro mobilità e la persistenza della direzione del movimento sono perturbate dallo stato redox del PEDOT:TOS. In particolare, questi parametri sono superiori per la regione ossidata del PEDOT e diminuiscono gradualmente verso l'estremità ridotta del film, come mostrato nella *Figura 3.8*. Questo effetto può essere spiegato come una dipendenza dell'adesione cellulare dallo stato di ossido-riduzione della superficie, dovuto ad un adsorbimento elevato di proteine di adesione contenute nel siero del mezzo di coltura, come ad esempio la fibronectina, nella regione ossidata dello strato polimerico [27].

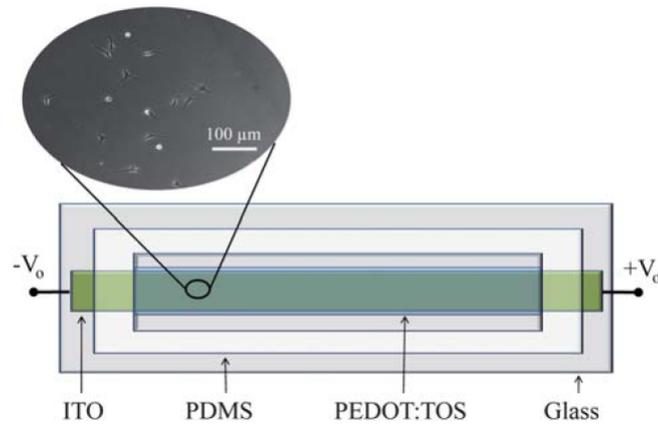


Figura 3.7: Schema del dispositivo utilizzato per ottenere potenziali di ossido-riduzione lineari.

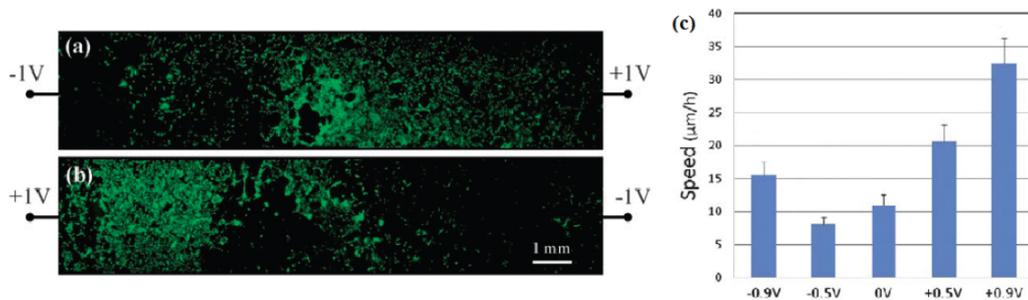


Figura 3.8: (a)(b) Immagini in fluorescenza di proliferazione cellulare in due dispositivi polarizzati in direzioni opposte; (c) Velocità di migrazione cellulare su film di PEDOT:PSS in funzione del potenziale di ossido-riduzione.

Come strumenti di studio della crescita cellulare, questo tipo di dispositivi bioelettronici hanno il vantaggio di una maggior semplicità operativa e di un buon controllo elettronico. Inoltre il gradiente redox viene stabilito automaticamente, e la tensione applicata controlla la polarizzazione e la sua direzione. Il meccanismo esatto che porta a questi risultati non è ancora ben compreso al momento, e potrebbe essere dovuto a diversi fattori, quali i cambiamenti nella bagnabilità e la successiva adesione di proteine di adsorbimento o cambiamenti nella topografia del substrato.

# Capitolo 4

## Materiali e metodi

In questo capitolo verranno presentate le procedure e gli eventuali accorgimenti adottati durante gli esperimenti. Inizieremo introducendo la linea cellulare di cui si é fatto uso negli esperimenti, per poi passare alla descrizione dei preparati biologici e degli altri materiali utilizzati sia nella caratterizzazione elettrofisiologica, sia nel caso delle registrazioni su PEDOT.

### 4.1 Linea cellulare utilizzata: T98G

Le cellule utilizzate in questo lavoro di tesi sono identificate dalla sigla T98G che sta ad indicare che si tratta di cellule umane della glia di origine tumorale. Nello specifico derivano da cellule di glioblastoma multiforme isolate da un individuo maschile di razza caucasica. Sono state acquistate presso l'istituto *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) e vengono coltivate in laboratorio per garantire con continuità il materiale biologico necessario per i diversi esperimenti. L'utilizzo di cellule tumorali offre il duplice vantaggio di studiare materiale biologico ad alto interesse biomedico unito alla loro facilitá di mantenimento in coltura; infatti non presentano fenomeni di senescenza cellulare e possono essere considerate un buon modello per cellule piú delicate ed esigenti, come i fibroblasti dermici umani.

#### 4.1.1 Breve descrizione dei gliomi

Le cellule gliali rappresentano una classe di cellule molto importante per il sistema nervoso; sono circa dieci volte piú numerose dei neuroni, sebbene abbiano dimensioni minori, e svolgono soprattutto una funzione nutritiva e di sostegno per quest'ultimi, favorendone l'isolamento elettrico e la trasmissione dei potenziali d'azione. Contrariamente ai neuroni le cellule della neuroglia si riproducono per tutta la vita dell'individuo e, poiché possiedono diversi gradi di specializzazione, vengono identificati con nomi differenti; tra i piú importanti ricordiamo gli astrociti, che ancorano i neuroni al loro rifornimento di sangue

e regolano l'ambiente chimico della matrice intersiziale riciclando i neurotrasmettitori rilasciati durante la trasmissione sinaptica, e gli oligodendrociti i quali facilitano il metabolismo dei neuroni e rivestono i loro assoni con la guaina mielinica. Nello specifico le cellule T98G di glioblastoma multiforme rappresentano una forma tumorale molto grave degli astrociti, e per questo motivo tale glioma viene anche chiamato astrocitoma di grado IV.

Le forme tumorali della glia sono cellule cancerose particolari in grado di adattare la loro biologia per vivere in spazi confinati, infatti non possono espandersi a meno di non sottrarre spazio ai neuroni, che vengono uccisi tramite il rilascio di elevate concentrazioni di glutammato [28]. Un secondo aspetto unico, riguarda il modo in cui i gliomi diffondono nell'organismo creando metastasi. Infatti a differenza di altri tumori, che si diffondono per via ematica, i gliomi sono incapaci di attraversare i vasi sanguigni, di conseguenza non formano metastasi in altri organi; tuttavia si sviluppa in modo abbastanza efficace nel cervello e il midollo spinale.

Per quanto riguarda le proprietà elettriche possiamo dire che le cellule della glia sono cellule elettricamente non eccitabili, in grado quindi di dare origine solamente ad una risposta di tipo passivo, attraverso potenziali graduati. Inoltre mentre le cellule normali mantengono un potenziale di riposo di circa -80 mV, le cellule tumorali sono più depolarizzate ed hanno un potenziale di circa -40 mV [29]; questa caratteristica sembra essere dovuta alla mancanza di canali *inward rectifying* del  $K^+$ .

Sia gli astrociti che gli oligodendrociti esprimono la proteina  $K_{ir}4.1$ , un tipo particolare di canali di leakage del potassio, presentati in precedenza in *Figura 1.11*, sensibili al  $Ca^{2+}$  e  $Ba^{2+}$ , che nello stato di riposo della membrana cellulare hanno alta probabilità di essere aperti, generando una permeabilità al  $K^+$  molto particolare e tipica di questa cellule. Al contrario nelle forme tumorali i canali  $K_{ir}4.1$  presentano una ridotta attività perché sono racchiusi in compartimenti dove non possono partecipare integralmente alla conduttanza del  $K^+$  e questa inibizione sembra essere alla base della loro rapida crescita [30].

Sebbene i gliomi non esprimano significativamente canali funzionali di tipo  $K_{ir}4.1$ , sono caratterizzati dalla presenza di canali ad alta conduttanza del  $K^+$  attivati dal  $Ca^{2+}$  e identificati in precedenza con il termine BK. Dato che i canali BK sono quelli maggiormente espressi in questo tipo di tumori sono anche i più significativi per la conduttanza del  $K^+$ . Inoltre da alcuni studi è emerso che sono attivati da ligandi specifici che sembrano essere coinvolti nel processo metastatico [31]; è possibile quindi che studi ulteriori possano confermare e chiarire tale correlazione, con la possibilità di limitare la proliferazione delle cellule tumorali, agendo specificatamente e in modo mirato su questo tipo di canali di diffusione del  $K^+$ .

Il flusso cationico dei  $K^+$ , generato dai canali BK, è bilanciato da una controparte anionica, rappresentata da  $Cl^-$ . È stato dimostrato che alcuni tipi di canali ionici del  $Cl^-$  sono coinvolti nel processo di espansione dei gliomi, dato che la loro soppressione tramite

trattamenti farmacologici mirati ha mostrato una effettiva inibizione della loro crescita, sia in vitro che in vivo [28]. Tuttavia in questo lavoro siamo interessati essenzialmente alla corrente potassio e non approfondiremo ulteriormente tali argomentazioni.

### 4.1.2 Le colture cellulari

Come già accennato il materiale biologico viene tenuto in coltura all'interno del laboratorio stesso. Le cellule sono mantenute in incubatore a  $37.8^{\circ}\text{C}$ , in atmosfera umidificata con il 5% di  $\text{CO}_2$ . Il mezzo di coltura é costituito da *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), al quale viene aggiunto il 10% di siero fetale bovino, l'1% di L-glutammina, il 10% di sodio piruvato e infine antibiotici, in particolare l'1% di penicillina e 1% di streptomycin. Il terreno cosí preparato viene etichettato come "*RPMI completo*" e conservato in frigo. Tutti questi materiali provengono dalla Sigma Chemical Italy.

Le cellule sono controllate periodicamente per verificare l'assenza di qualsiasi contaminazione batterica. Al momento di eseguire le registrazioni elettrofisiologiche si controlla al microscopio che le cellule abbiano raggiunto il giusto grado di confluenza nella fiasca, in modo tale da procedere con il protocollo di rinnovo della coltura ed utilizzare le cellule in eccesso per gli esperimenti.

In condizioni di crescita normali questo tipo di cellule raggiunge un grado di confluenza di quasi il 90% in soli tre giorni di incubazione, come si osserva dalla curva di proliferazione di *Figura 4.1*.



Figura 4.1: Curva di crescita delle T98G riportata nel sito web dell'ECACC.

La procedura di rinnovo cellulare adottata per le T98G prevede l'utilizzo di tre elementi: il mezzo di coltura RPMI completo, il PBS e la tripsina-EDTA. Il PBS é una soluzione tampone comunemente utilizzata in biologia, mentre la tripsina é un enzima che viene utilizzato per staccare dalla piastra le cellule in coltura, che crescono per adesione.

Anche questi materiali sono frigo-conservati e al momento del loro utilizzo é necessario riscaldarli opportunamente per prevenire un possibile shock termico.

Il protocollo prevede i seguenti step:

- aspirazione tramite pipetta pasteur di tutto il terreno di coltura presente nella fiasca giunta a confluenza;
- lavaggio della fiasca con PBS per due volte;
- aggiunta di 500  $\mu$ l di tripsina-EDTA e posizionamento in incubatore per qualche minuto;
- preparazione della nuova fiasca con circa 4.7 ml di terreno di coltura;
- controllo al microscopio dell'avvenuto distaccamento delle cellule dal fondo;
- sospensione delle cellule in 1.5 ml di terreno, prelievo e collocazione in una provetta sterile;
- prelievo di 300  $\mu$ l di questa soluzione da seminare nella nuova fiasca già pronta.

Durante questa procedura, che deve necessariamente avvenire sotto una cappa biologica per mantenere il tutto sterile, si deve fare attenzione a maneggiare tutti gli strumenti e gli utensili necessari in modo da prevenire ogni sorta di contaminazione delle cellule e delle soluzioni utilizzate, avendo cura di cambiare spesso le pipette pasteur. Al momento della semina sulla nuova fiasca vengono registrati i dati riguardanti il tipo di cellule che contiene, la loro provenienza, la data di rinnovo e per finire i passaggi che sono stati fatti, ossia il numero di volte che le cellule sono state rinnovate a partire dallo stesso ceppo originale.

Dopo aver prelevato il quantitativo di cellule necessario al rinnovo cellulare si prelevano 50  $\mu$ l della soluzione contenente le cellule in sospensione e si seminano sul fondo di una piastra petri per materiale biologico in polistirene. Si rimettono in incubatore per circa 15 minuti e poi si verifica al microscopio che le cellule si siano adese sul fondo, in modo da poter procedere con la sostituzione del mezzo di coltura con la soluzione elettrolitica necessaria per le registrazioni in voltage clamp.

## 4.2 Registrazioni in voltage clamp

Tutti gli esperimenti sono stati condotti ad una temperatura variabile tra i 20° e i 25°. La corrente di membrana é stata registrata in configurazione whole cell utilizzando l'amplificatore *EPC-10* guidato dal software *Patch Master* (HEKA Instruments, Darmstadt, Germany). Il protocollo di stimolazione si compone di 8 diversi step di potenziale, a partire da -30 mV fino ad arrivare a +110 mV, con incrementi successivi di 20 mV; la durata della stimolazione é pari a 100  $\mu$ s, mentre il tempo che intercorre tra uno step e l'altro é stato impostato ad un 1 s. Per maggior chiarezza in *Figura 4.2* viene mostrato un esempio di applicazione di questo protocollo di stimolazione con le corrispondenti correnti ioniche registrate.

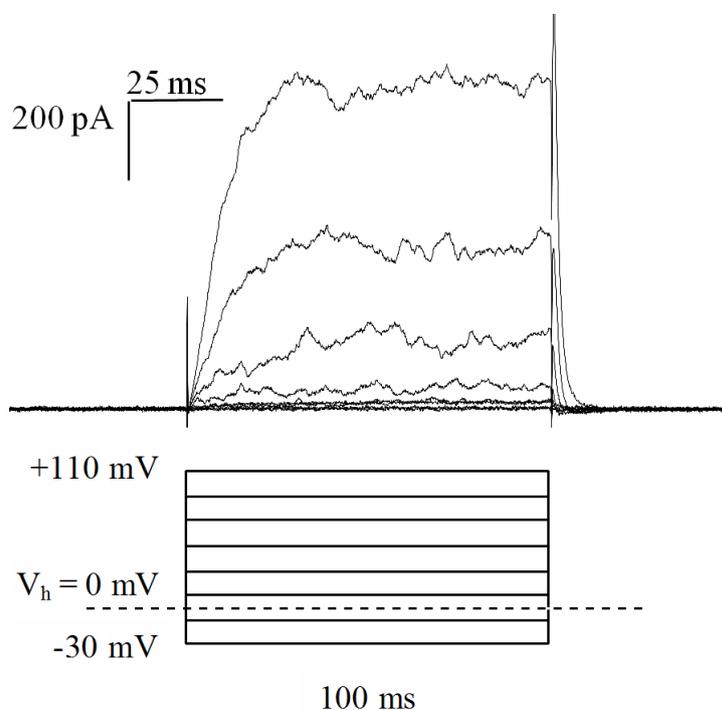


Figura 4.2: Protocollo di stimolazione e relative correnti ioniche indotte.

Una funzione specifica del software permette di compensare eventuali transienti capacitivi troppo veloci e di sottrarre le dispersioni di leakage dalla corrente registrata; tutto questo viene eseguito on-line ogni 10 s. Il software inoltre puó essere impostato in modo da misurare in automatico la capacitá della membrana cellulare e il potenziale di riposo. La resistenza delle micropipette, fabbricate e riempite dell'apposita soluzione elettrolitica, secondo le tecniche e i metodi esposti nel seguito, si mantiene tra i 4 e i 6 M $\Omega$ . La densitá di corrente é ottenuta dividendo l'ampiezza della corrente per la capacitá della cellula. Partendo dalla capacitá della membrana cellulare é possibile stimare il raggio e la superficie cellulare tramite la modellizzazione della cellula con un capacitore sferico, infatti per tempi variabili da pochi minuti a qualche ora le cellule non risultano

completamente adese sul fondo della petri e mantengono con buona approssimazione una forma sferoidale.

Nel corso dell'analisi si é fatto uso del software Clampfit (Molecular Devices, LLC.) grazie al quale sono stati ricavati i valori sperimentali dell'ampiezza di corrente. In questo modo é possibile associare ad ogni stimolo di potenziale un unico valore di intensità di corrente, ottenuto effettuando una media sull'intero set di cellule registrate durante l'esperimento e limitando di conseguenza la variabilità biologica intrinseca. Di questi risultati sono stati realizzati dei grafici di intensità di corrente in funzione del potenziale di stimolazione, denominate curve I-V nel seguito; tutti i dati sono stati espressi nella forma ( $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ). Per quanto riguarda l'analisi statistica é stato effettuato il test t di Student per stimare con quale probabilità i valori ottenuti da due diverse condizioni sperimentali risultassero non correlati. Per considerare statisticamente significativa la risposta del test é stata scelta una soglia minima di probabilità di 0.05.

#### 4.2.1 Fabbricazione e montaggio delle micropipette

La fabbricazione delle pipette consiste in due processi principali che prevedono la forgiatura, ossia il restringimento del diametro del capillare, attraverso il Puller, e una successiva pulizia della punta della micropipetta con trattamento termico tramite la microforgia.

In tutti gli esperimenti di voltage clamp sono stati utilizzati capillari standard della Harvard Apparatus (*Figura 4.3(a)*) costituiti da vetro borosilicato (Pyrex). Una volta preparate le pipette si presentano come quelle mostrate in *Figura 4.3(b)*.



(a) Capillari in vetro borosilicato



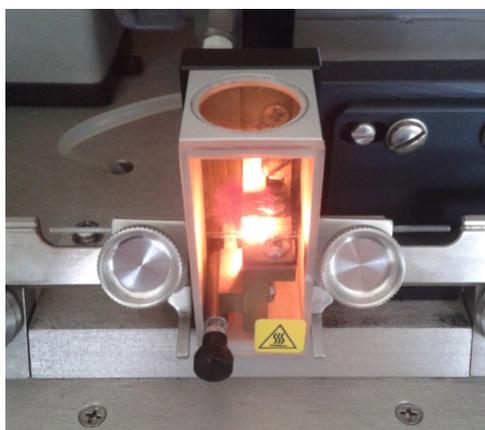
(b) micropipette pronte per l'utilizzo

Figura 4.3: Alcuni dettagli riguardanti la preparazione delle micropipette.

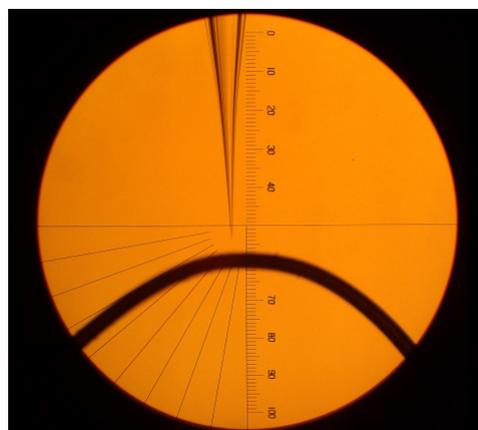
I capillari vengono collocati all'interno del Puller su un'apposita guida, in modo tale che ogni estremità sia fissata ad un carrello mobile. La parte centrale del capillare si posiziona all'interno della cella dove é presente una resistenza elettrica laminare e ricurva

ad anello. Grazie al passaggio di corrente, la resistenza si scalda fino a raggiungere la temperatura necessaria per fondere il vetro, contemporaneamente l'apparecchio esercita una adeguata trazione orizzontale (*Figura 4.4(a)*). Il punto di partenza consiste in una pre-forgiatura, che prevede di restringere il diametro fino ai  $200\ \mu\text{m}$  allontanando le estremità del capillare per una lunghezza di circa 1 cm. Successive applicazioni di calore per tempi più brevi permettono di ottenere diametri molto sottili, fino a circa  $1\ \mu\text{m}$ , con conseguente rottura del capillare in due pipette utilizzabili. Per ottenere molte pipette con proprietà simili è necessario memorizzare i parametri del processo, infatti piccole variazioni nel calore generato o nella lunghezza di trazione portano a grandi differenze nei diametri delle pipette. Dopo questo processo le pipette sono conservate in appositi contenitori.

Al momento dell'utilizzo si procede con la pulizia della punta esterna della pipetta. Come abbiamo anticipato precedentemente questa operazione viene eseguita per mezzo di un microscopio a basso ingrandimento, posizionando la cannula, tramite un macromanipolatore a tre dimensioni, sopra ad un filamento di platino-iridio (Pt-Ir) "ripiegato ad U" ad una distanza di circa  $20\ \mu\text{m}$  (*Figura 4.4(b)*). Scaldando elettricamente il filamento si genera un flusso d'aria calda che investe la punta della pipetta rimuovendo eventuali difetti superficiali e il pulviscolo depositato. Dopo questo processo di pulizia le pipette devono essere utilizzate immediatamente per evitare facili rotture.



(a) Operazione di forgiatura con il Puller: i bracci orizzontali del Puller sottopongono a trazione le estremità del capillare mentre viene scaldato



(b) Pulizia della pipetta con microforgia: per mezzo dell'obiettivo si dispone la punta della pipetta sopra il filamento di Pt-Ir

Figura 4.4: Alcuni dettagli del processo di fabbricazione delle micropipette.

Una volta preparata, la micropipetta viene montata su un apposito sostegno, il cui schema è riportato in *Figura 4.7*. Sostanzialmente consiste in una struttura montata su un micromanipolatore in cui troviamo all'interno parti di materiale plastico (T1, T2, T3), che fungono principalmente da guida per la micropipetta (P), mentre nella parte più

esterna é presente un involucro metallico con azione schermante ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ). L'uscita  $S$  é collegata ad un tubo di gomma in silicone attraverso il quale é possibile applicare un'aspirazione, generalmente per via orale. Poiché il puntale puó muoversi leggermente durante l'aspirazione, strappando di conseguenza una porzione della membrana della cellula, é presente una coppia di guarnizioni del tipo O-ring ( $O_1$  e  $O_2$ ), che bloccano perfettamente la micropipetta senza danneggiarla. All'interno della cannula, immerso in una particolare soluzione elettrolitica, é presente l'elettrodo metallico, costituito da un filamento di argento, precedentemente clorurato, al quale é saldato il pin del connettore BNC in modo da assicurare il necessario collegamento elettrico con il pre-amplificatore.

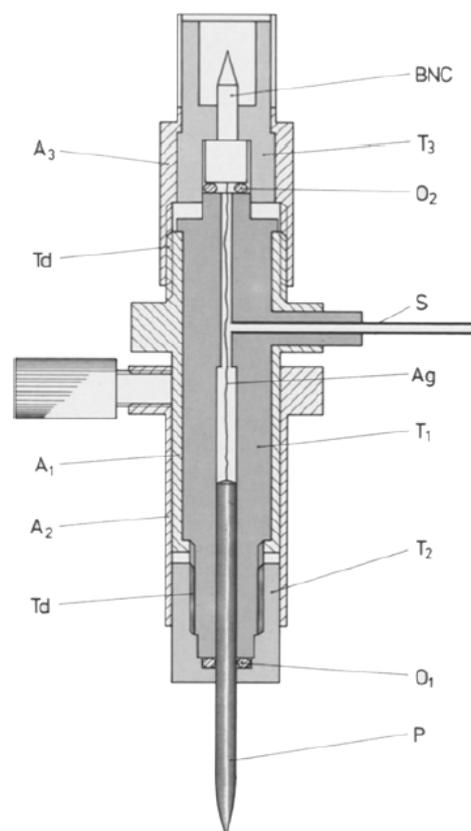


Figura 4.5: Sezione del supporto meccanico della micropipetta.

## 4.3 Preparazione dei campioni

In questa sezione descriveremo i materiali e le procedure adottate per la preparazione dei campioni, con particolare riguardo alle soluzioni utilizzate, ai substrati di PEDOT:PSS e ai test di proliferazione cellulare.

### 4.3.1 Soluzioni e bloccanti

Per poter procedere a registrare le correnti ioniche é necessario sostituire il mezzo di coltura presente all'interno della petri con la soluzione che costituisce il bagno cellulare. Questa soluzione elettrolitica, che per chiarezza chiameremo "esterna", contiene i seguenti elementi, tutti espressi in concentrazione molare (mM): 133 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) e infine 10 glucosio; il tutto é portato a pH 7,4 con aggiunta di NaOH.

Analogamente la soluzione dell'elettrodo, che chiameremo "interna", é composta da (in mM): 10 NaCl, 120 K-aspartate, 2 MgCl<sub>2</sub>, 4 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), 3 Mg-ATP e 0.2 GTP-Tris; ed é portata a pH 7.2 tramite aggiunta di KOH.

Per quanto riguarda la preparazione delle soluzioni bloccanti sostanzialmente si tratta di disciogliere una piccola concentrazione di farmaco all'interno della soluzione esterna. Ad esempio per preparare la soluzione bloccante che ci permette di verificare la presenza di canali potassio, si aggiungono 10 mM di TEA in una soluzione esterna contenente, invece che 133 mM di NaCl, solamente 123 mM.

Nel caso delle tossine abbiamo dovuto preparare due soluzioni; la prima contenente solamente iberiotossina (IbTx) e la seconda contenente sia iberiotossina che dendrotossina (IbTx+DTx). Queste tossine sono conservate a bassa temperatura all'interno di eppendorf in una concentrazione tale che, se diluite in 10 mL di soluzione esterna, permette di ottenere per entrambe le soluzioni bloccanti una concentrazione di lavoro pari a 100 nM.

I bloccanti vengono perfusi nel bagno cellulare ad un rate di 1 ml/minuto attraverso una cannula metallica che é collegata, come abbiamo visto in precedenza, ad un sostegno sopraelevato in modo da sfruttare semplicemente la gravitá per far defluire la soluzione. Per verificare la reversibilitá dell'inibizione dei canali ionici causata dai bloccanti viene praticato il *wash out*, che consiste nell'interrompere il flusso del farmaco per un determinato periodo; ció é possibile agendo sulla valvola per mezzo del software.

### 4.3.2 Preparazione dei substrati di PEDOT:PSS

Il PEDOT:PSS elettrodepositato ci é stato fornito dal laboratorio di fisica della materia della Prof. Fraboni. Viene preparato per elettrosintesi, sfruttando come superficie conduttiva un film sottile di PEDOT:PSS precedentemente depositato sopra un vetrino per spin coating. La procedura di preparazione prevede tre fasi:

**Pulizia del vetrino** il vetrino viene immerso in una soluzione detergente a base di acqua e Ausilab e sottoposto ad un trattamento ad ultrasuoni per 5 minuti; successivamente si lava accuratamente con acqua distillata e lo si ripone in acetone dove é nuovamente sottoposto ad ultrasuoni per altri 5 minuti. Infine si estrae il vetrino dal liquido e lo si lascia asciugare all'aria;

**Deposizione per spin coating di uno strato di PEDOT:PSS commerciale** Si pone il vetrino nello spin coater, si ricopre con la sospensione commerciale di PEDOT:PSS Clevios CPP105 D, e si fa ruotare a una velocità di 700 rpm per 10 s. Sulla superficie del vetrino si forma una pellicola sottile di sospensione di PEDOT:PSS, che dopo essere stata essiccata per 40 minuti a 140°C forma un film compatto dello spessore di circa 200 nm;

**Elettropolimerizzazione dell'EDOT** l'elettrodeposizione é stata effettuata in una cella a tre elettrodi a flusso d'azoto (*Figura 5.2(a)*), in cui l'elettrodo di lavoro é costituito dal film sottile di PEDOT:PSS precedentemente preparato, l'elettrodo di riferimento é un elettrodo a calomelano saturo (SCE) e il contro elettrodo é un filo di oro. Per svolgere l'elettrodeposizione é stato impiegato un potenziostato eDAQ controllato da un personal computer tramite il software eDAQ chart. L'elettropolimerizzazione é avvenuta in soluzione acquosa contenente EDOT 10 mM e PSS 0.1 mM in condizioni potenzio dinamiche (tecnica voltammetria ciclica). Il potenziostato é stato impostato con i seguenti parametri: scan rate = 100 mV/s, low potential = 0 V, high potential = + 1.5 V, number of cycles = 8 (ED8). Il dispositivo cosí preparato viene lavato con acqua distillata e lasciato asciugare all'aria.

Nello specifico il processo di polimerizzazione dell'EDOT é innescato dalla sua ossidazione. Infatti la perdita di elettroni porta alla formazione di radical cationi e conseguenti reazioni di accoppiamento, da cui si originano specie polimeriche insolubili che precipitando sulla superficie elettrodica sono in grado di inglobare il PSS.

Una volta elettrodepositato, il film di PEDOT:PSS subisce un ulteriore processo tramite il quale viene polarizzato. I campioni sono ossidati e ridotti applicando per 1 h un potenziale di +0.8/-0.9 V rispetto all'elettrodo di riferimento (SCE) immerso in una soluzione di tampone fosfato (PBS) 0.1 M. Dopo la polarizzazione si lava l'elettrodo con acqua e lo si lascia asciugare; i campioni si presentano come in *Figura 4.6(b)*.

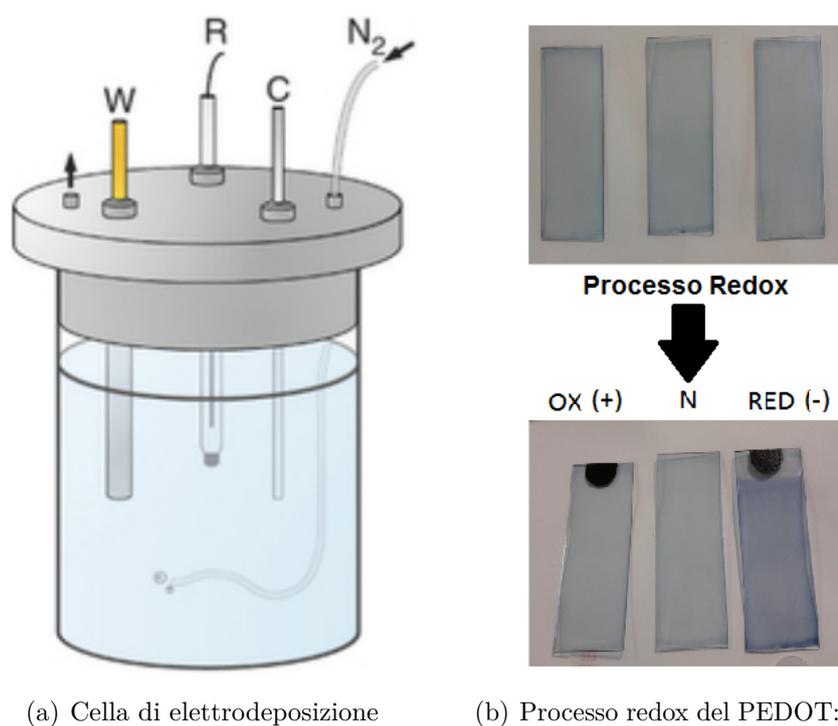


Figura 4.6: Preparazione dei substrati di PEDOT:PSS. (a) I simboli indicano: l'elettrodo di lavoro (W), l'elettrodo di riferimento (R) e il contro elettrodo (C); il tutto é mantenuto in atmosfera di azoto ( $N_2$ ). (b) I campioni polarizzati assumono colori differenti; da sinistra: ossidato (OX), neutro (N) e ridotto (RED).

I substrati di PEDOT:PSS devono essere conservati all'interno di petri ed utilizzati in breve tempo. Al momento dell'utilizzo vengono lavati per due volte con PBS lasciandoli in immersione per circa un minuto per rendere la superficie adatta alla semina delle cellule; successivamente si procede come già illustrato in precedenza.

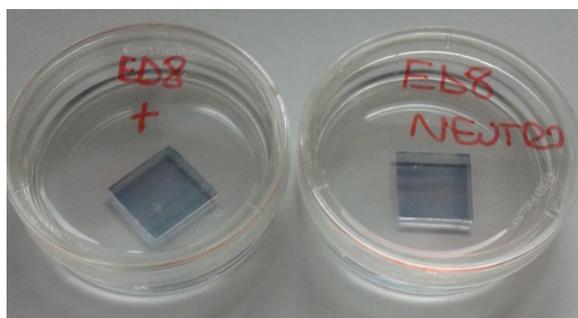


Figura 4.7: Petri contenenti due campioni di PEDOT:PSS elettrodepositato (ED8).

### 4.3.3 Test di proliferazione

Come vedremo meglio nel prossimo capitolo i risultati delle registrazioni per i diversi stati di ossido-riduzione del PEDOT:PSS sono stati confrontati con le curve di proliferazione ottenute dalle stesse cellule T98G cresciute su tali substrati. Per questi esperimenti è stata utilizzata una piastra multiwell a 24 pozzetti. In ognuna di queste vaschette sono state seminate 20000 cellule in 500  $\mu$ l di RPMI utilizzando come substrato il PEDOT:PSS neutro, ossidato e ridotto, oltre che direttamente la superficie sterile del fondo della piastra in polistirene, trattata adeguatamente per renderla idrofilica. Le cellule sono state mantenute per 24h in condizioni standard di coltura per permettere loro di aderire prima di essere osservate.

Le immagini sono state acquisite in contrasto di fase ad un ingrandimento di 100x per un intervallo di tempo fino a 168 ore (sette giorni) attraverso il microscopio ottico inverso automatizzato Nikon Eclipse-Ti. La proliferazione è stata successivamente analizzata in base alle immagini acquisite contando, per ogni substrato testato, le cellule presenti in tre campi visivi derivanti da tre diversi pozzetti adiacenti. L'esperimento è stato replicato per tre volte in giorni diversi. L'analisi di questi dati si basa sulla determinazione del numero medio di cellule seminate sui diversi substrati di coltura e per gli intervalli di tempo considerati. I risultati sono stati espressi nella forma ( $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ) e sono stati graficati in istogrammi.

Uno schema di questa procedura è riportata in *Figura 5.2(b)*, dove si può osservare la piastra multiwell e un dettaglio della coltura cellulare.

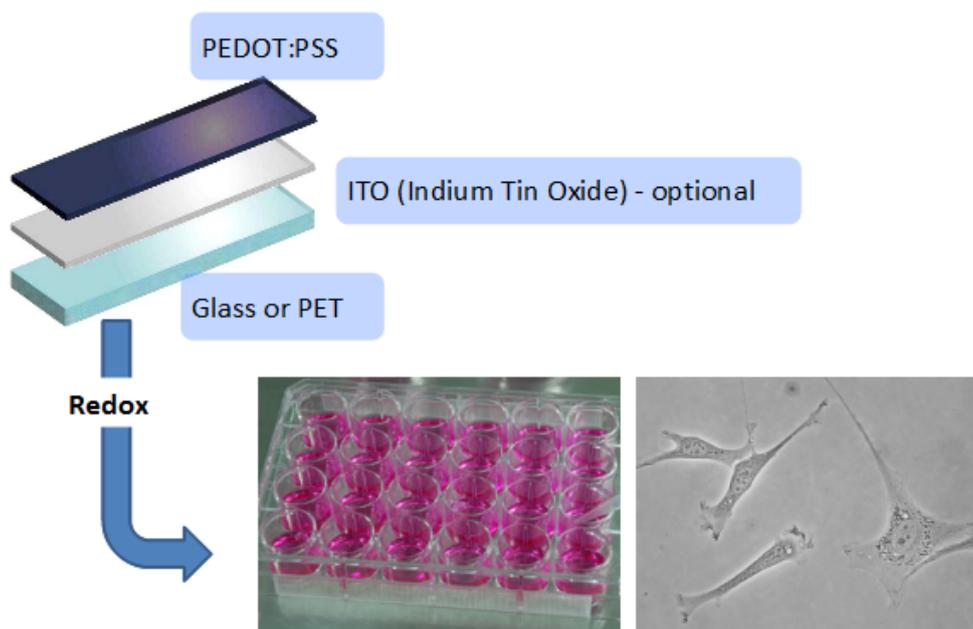


Figura 4.8: Procedura per test di proliferazione su PEDOT:PSS.

# Capitolo 5

## Risultati e discussione

La struttura di questo capitolo é stata concepita in modo tale da presentare nelle prime pagine tutti i risultati degli esperimenti condotti e successivamente affrontare le necessarie considerazioni e osservazioni in merito.

### 5.1 Presentazione dei risultati

I risultati ottenuti utilizzando le cellule T98G comprendono:

- caratterizzazione delle proprietà elettrofisiologiche (5.1.1);
- registrazione di correnti su PEDOT:PSS (5.1.2);
- valutazione delle proprietà proliferative su PEDOT:PSS (5.1.3).

Nel sottocapitolo 5.1.1 sono presentate, a titolo esemplificativo, alcune delle tracce delle correnti registrate al momento dell'esperimento. Per maggior chiarezza si é preferito sovrapporre in un unico grafico sia le tracce di controllo, che quelle ottenute in seguito all'applicazione dei bloccanti. Successivamente sono state inserite le curve I-V derivate dall'analisi dei dati. Tutte le correnti sono state registrate in configurazione whole cell a partire da cellule adese sulla superficie della piastra petri.

Durante gli esperimenti sono state identificate due popolazioni di cellule con proprietà elettriche profondamente differenti, indicate nelle pagine che seguono con "Gruppo A" e "Gruppo B"; di conseguenza l'analisi delle correnti é stata strutturata sulla base di questa distinzione.

Nel sottocapitolo 5.1.2 vengono mostrati i risultati dell'analisi delle registrazioni in whole cell delle correnti ioniche ottenute da cellule seminate, sia direttamente sul fondo della petri (Control), costituita da polistirene, sia sulla matrice polimerica di PEDOT:PSS, precedentemente sottoposta ad un processo di ossido-riduzione per ottenere un substrato ossidato, ridotto e neutro.

Le curve I-V derivanti dai diversi stati redox del PEDOT:PSS e dal Control sono state inserite in un unico grafico per facilitare l'interpretazione dei risultati; in questo caso le tracce delle correnti non sono state inserite essendo di per se' poco significative. Per evidenziare maggiormente alcune caratteristiche dei dati raccolti dipendenti dallo stato di ossido-riduzione del substrato, é stato sviluppato, a titolo esemplificativo, un grafico dei residui, dove in ordinata é presente lo scarto dell'ampiezza di corrente dal valor medio ottenuto dal set di cellule registrate, mentre in ascissa compare l'ordine progressivo delle varie tracce.

Nel sottocapitolo 5.1.3 vengono riportati diversi istogrammi elaborati a partire da dati riguardanti le capacità di proliferazione delle cellule T98G seminate su PEDOT:PSS nei diversi stati di ossido-riduzione. Le colture sono state monitorate per un arco di tempo complessivo di 72 ore.

## 5.1.1 Caratterizzazione delle proprietà elettriche delle T98G

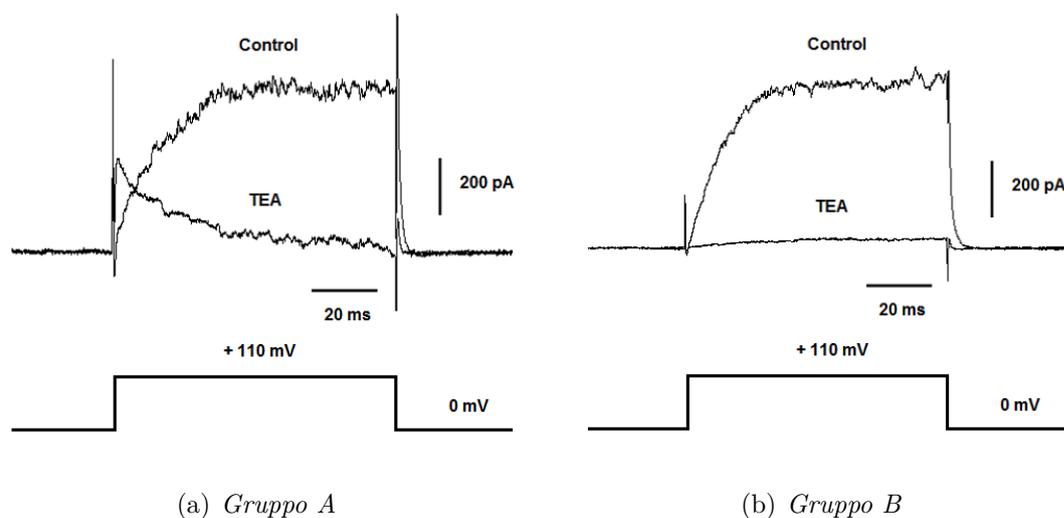


Figura 5.1: Esempio di confronto tra le tracce di corrente registrate in configurazione whole cell in T98G ottenute in seguito a stimolazione con potenziale di +110 mV, prima (Control) e dopo perfusione con bloccante non specifico per correnti potassio (TEA, 10 mM).

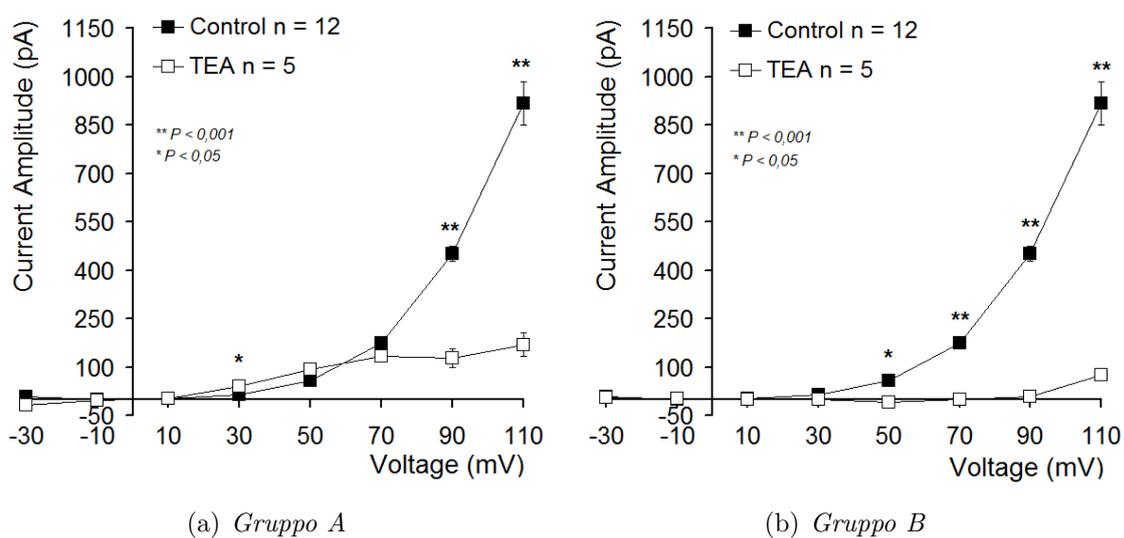


Figura 5.2: Media dell'ampiezza ( $\pm$  S.E.M.) delle correnti registrate in configurazione whole cell in funzione del potenziale di stimolazione (curve I-V), ottenute prima e dopo perfusione di TEA (10 mM). Student's t test: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,001$ .

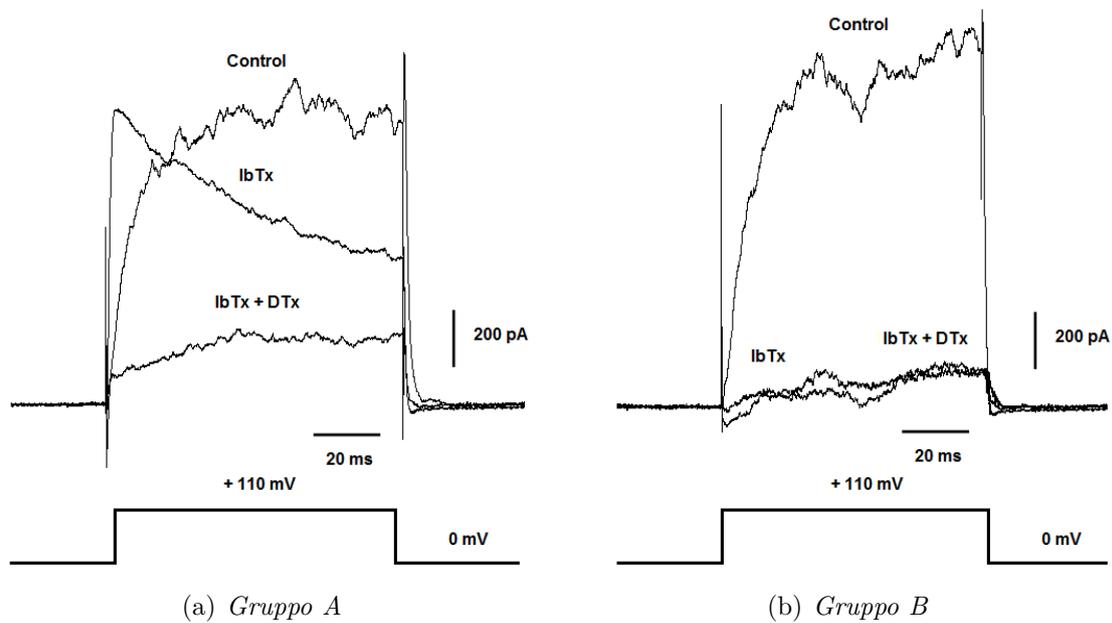


Figura 5.3: Esempio di confronto tra le tracce di corrente registrate in configurazione whole cell in T98G ottenute in seguito a stimolazione con potenziale di +110 mV, prima (Control) e dopo perfusione con bloccanti specifici per correnti potassio (IbTx e DTx, 100 nM).

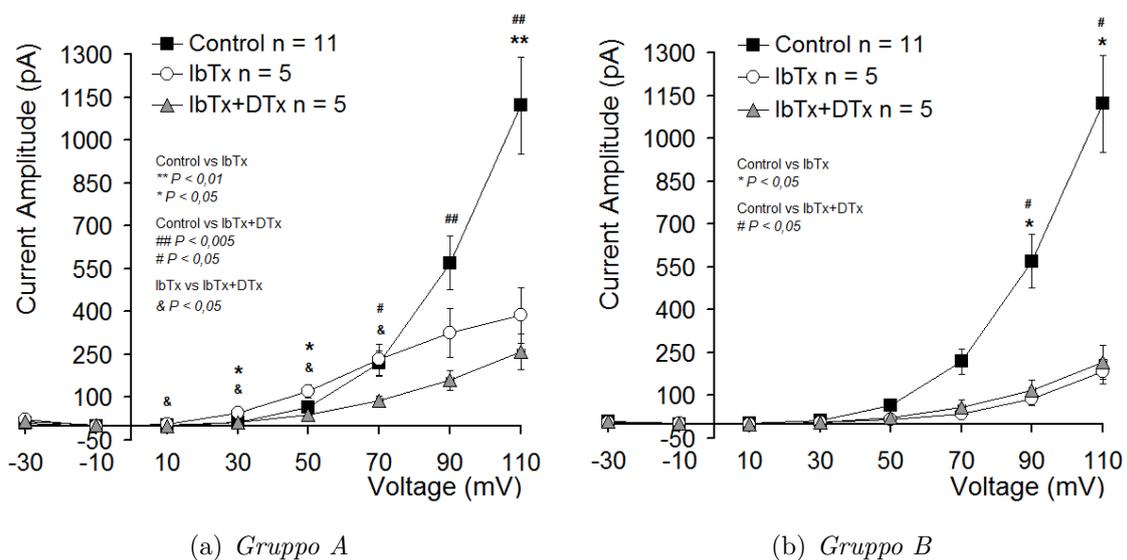


Figura 5.4: Media dell'ampiezza ( $\pm$  S.E.M.) delle correnti registrate in configurazione whole cell in funzione del potenziale di stimolazione (curve I-V), ottenute prima e dopo perfusione di IbTx e DTx (100 nM). Student's t test: Control vs IbTx \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; Control vs IbTx+DTx ## $P < 0,005$ , # $P < 0,05$ ; IbTx vs IbTx+DTx & $P < 0,05$ .

## 5.1.2 Registrazioni di correnti di T98G su PEDOT:PSS

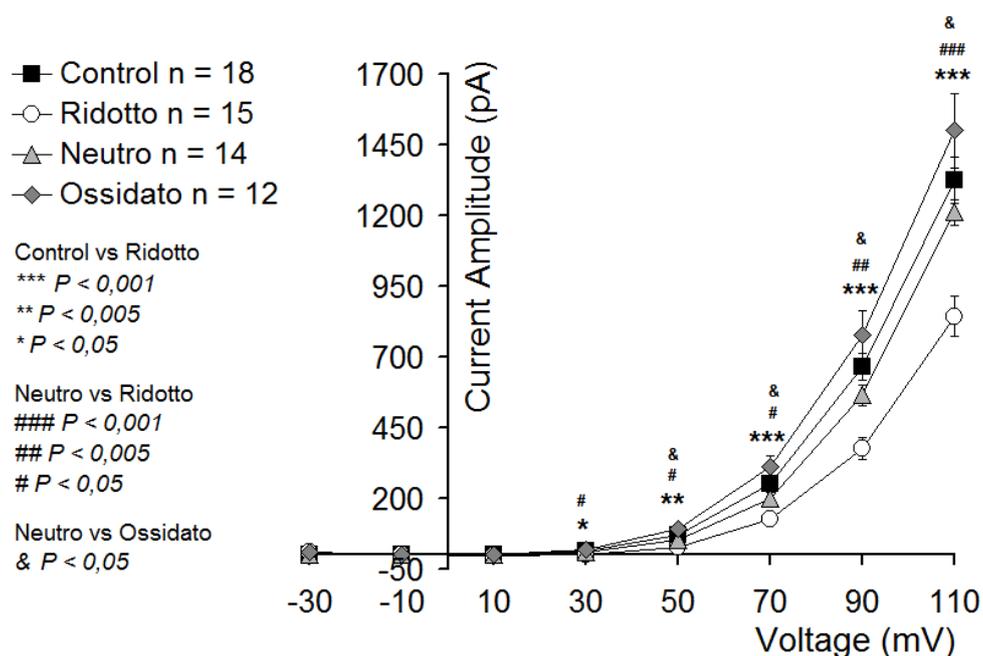


Figura 5.5: Media dell'ampiezza ( $\pm$  S.E.M.) delle correnti registrate in configurazione whole cell su petri (Control) e su PEDOT:PSS (ED8) neutro, ridotto e ossidato. Student's t test: Control vs Ridotto \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,005$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; Neutro vs Ridotto # $P < 0,05$ , ## $P < 0,005$ , ### $P < 0,001$ ; Neutro vs Ossidato & $P < 0,05$ .

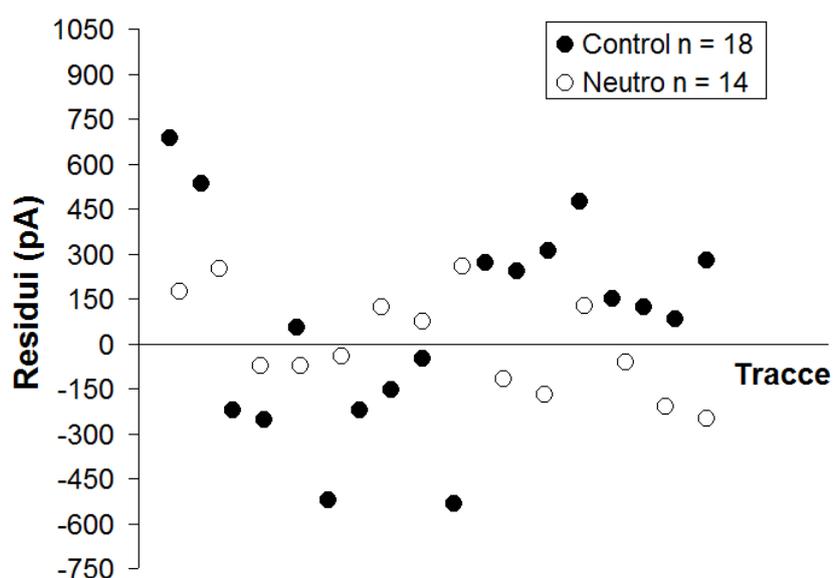


Figura 5.6: Esempio di un grafico dello scarto dell'ampiezza di corrente dal valor medio (residui), per cellule del controllo e PEDOT:PSS (ED8) neutro, relativo al potenziale di stimolazione di +110 mV; in ascissa é riportata la sequenza di registrazione delle cellule.

### 5.1.3 Capacit  proliferativa di T98G su PEDOT:PSS

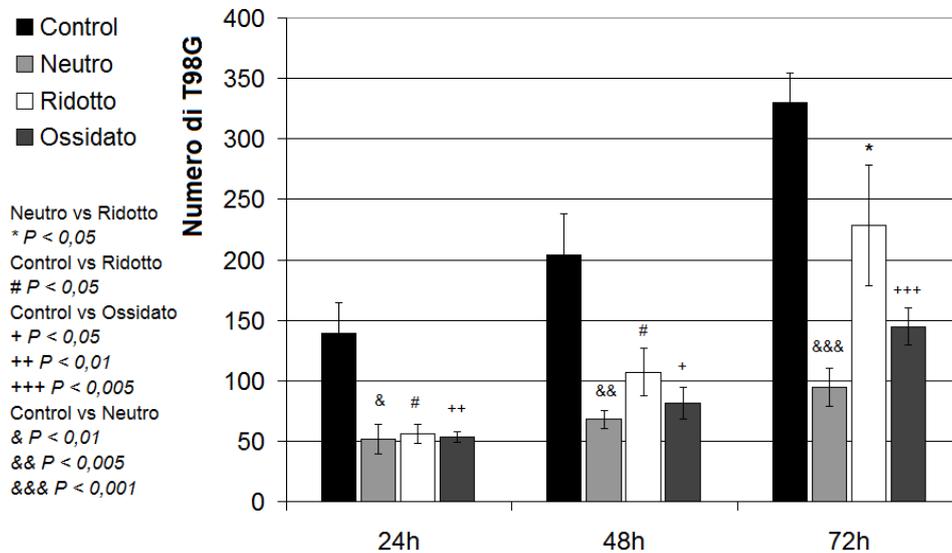


Figura 5.7: Istogramma del numero medio ( $\pm$  S.E.M.) di cellule T98G, a 24h, 48h e 72h dalla semina su piastre multiwell (control) e su PEDOT:PSS (ED8) neutro, ridotto e ossidato ( $n = 9$ ). Student's t test: Neutro vs Ridotto \* $P < 0,05$ ; Control vs Ridotto # $P < 0,05$ ; Control vs Ossidato + $P < 0,05$ , ++ $P < 0,005$ , +++ $P < 0,001$ ; Control vs Neutro & $P < 0,05$ , && $P < 0,005$ , &&& $P < 0,001$ .

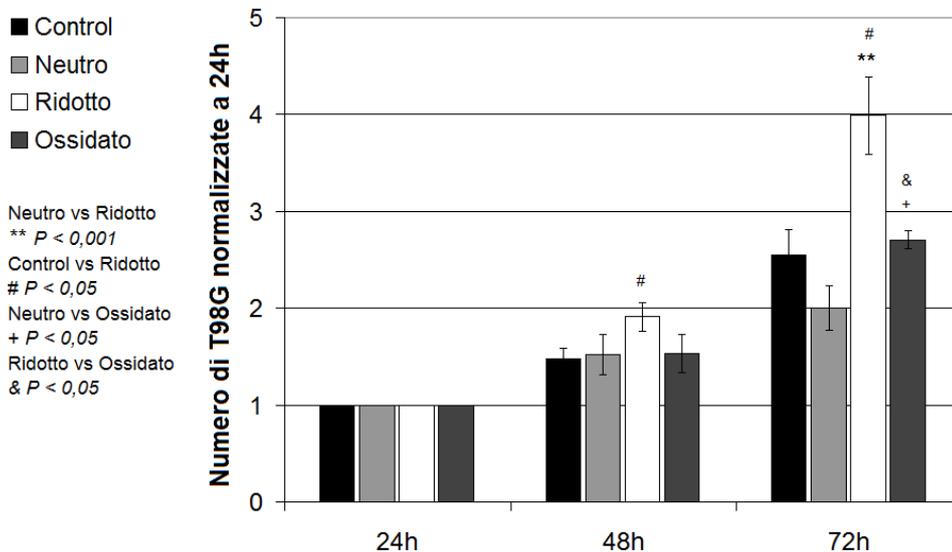


Figura 5.8: Istogramma normalizzato del numero medio ( $\pm$  S.E.M.) di cellule T98G, a 24h, 48h e 72h dalla semina su piastre multiwell (control) e su PEDOT:PSS (ED8) neutro, ridotto e ossidato ( $n = 9$ ). Student's t test: Neutro vs Ridotto \*\* $P < 0,001$ ; Control vs Ridotto # $P < 0,05$ ; Control vs Ossidato + $P < 0,05$ ; Ridotto vs Ossidato & $P < 0,05$ .

## 5.2 Osservazioni e commenti

I risultati ottenuti dagli esperimenti di caratterizzazione elettrofisiologica delle T98G hanno rivelato che, in seguito ad applicazione del bloccante non specifico dei canali potassio TEA, il maggior contributo della corrente whole cell registrata dipende da un flusso di ioni potassio diretto verso l'esterno della membrana cellulare (*Figure 5.1 e 5.2*).

Inoltre l'analisi delle curve corrente-voltaggio (I-V) ha evidenziato due popolazioni di cellule con proprietà elettrofisiologiche diverse, denominate arbitrariamente: Gruppo A e Gruppo B. Nel primo gruppo (*Figure 5.1(a) e 5.2(a)*) si osserva una corrente residua significativamente minore rispetto al controllo, per potenziali di stimolazione maggiori o uguali a +90 mV. Questo comportamento è riconducibile alla presenza di particolari canali potassio, TEA resistenti, ad inattivazione molto rapida appartenenti alla classe dei  $K_A$ .

Nel secondo gruppo invece la corrente totale è quasi completamente bloccata dal TEA evidenziando che le cellule registrate esprimono in membrana solo canali potassio TEA sensili (*Figure 5.1(b) e 5.2(b)*). Il leggero aumento in corrispondenza dell'ultimo potenziale di stimolazione (+ 110 mV) può essere trascurabile in quanto probabilmente originato in seguito ad una forte depolarizzazione della membrana plasmatica, che porta la cellula in una condizione molto lontana dal suo equilibrio fisiologico.

Per meglio caratterizzare il corredo dei canali potassio presenti sulla membrana di queste cellule sono stati utilizzati i bloccanti specifici iberiotossina (IbTx) e dendrotossina (DTx). I risultati ottenuti mostrano che nel caso del Gruppo B la corrente potassio è quasi completamente dovuta ai canali BK sensibili all'iberitossina; infatti in seguito alla sua applicazione la corrente totale viene quasi completamente annullata, e resta inalterata anche in seguito all'applicazione successiva di dendrotossina, evidenziando che, in questa sotto-popolazione, non sono espressi canali  $K_v1.1$  e  $K_v1.2$  (*Figure 5.3(b) e 5.4(b)*). Nel caso del Gruppo A, sebbene l'applicazione di iberiotossina sopprime parte della corrente potassio attribuibile ai canali BK (*Figure 5.3(a) e 5.4(a)*), l'ampiezza della corrente residua si mantiene superiore a quella registrata in seguito all'applicazione del TEA (*Figura 5.2(a)*). Inoltre dall'applicazione successiva di dendrotossina emerge che questa corrente residua è principalmente mediata dai canali  $K_v1.1$  e  $K_v1.2$ .

Alla luce di questi dati è possibile trarre delle conclusioni in merito alla tipologia dei canali espressi da queste cellule. Infatti, con riferimento alla *Tabella 1.2*, poiché il TEA, nelle concentrazioni utilizzate, è in grado di sopprimere anche la corrente dovuta al canale  $K_v1.1$ , ciò dimostra che la differenza tra le due sotto-popolazioni è determinata soprattutto dalla presenza o meno dei canali voltaggio dipendenti di tipo  $K_v1.2$ , espressi nel 44% delle cellule totali registrate (n=20). Questo risultato è stato osservato anche in fibroblasti dermici umani primari [32]. Il confronto con cellule ottenute da donatori anziani e centenari, in questo caso, ha evidenziato che durante il processo di invecchiamento la

percentuale delle cellule che esprimono un determinato fenotipo associato ai canali di membrana mostra un cambiamento nel tempo. In base a questi risultati si può dedurre che il riarrangiamento dei canali espressi in membrana potrebbe essere riconducibile all'attivazione di particolari sistemi di controllo cellulare, più o meno repressi, che favorirebbero l'espressione di alcuni canali ionici rispetto ad altri, in risposta agli stimoli ambientali in cui si sviluppano le cellule e/o dal regime di stress a cui sono sottoposte.

Da studi precedenti [33] è stato dimostrato che lo stato redox della matrice polimerica è in grado di influenzare molti processi biologici delle cellule come: l'adesione, la migrazione e la proliferazione.

I risultati degli esperimenti effettuati su cellule T98G hanno rivelato che le correnti ioniche sono influenzate dallo stato di ossido-riduzione del substrato a cui aderiscono (*Figura 5.5*). In particolare l'ampiezza delle correnti registrate da cellule adese a PEDOT:PSS è significativamente minore, rispetto al controllo, quando seminate sul polimero ridotto, e significativamente maggiore in seguito ad ossidazione del materiale. È rilevante osservare che l'ampiezza di corrente registrata sul polimero neutro non è significativamente diversa dal controllo.

Una successiva analisi dello scarto dal valor medio dell'ampiezza di corrente (residui), ottenuto dalle cellule registrate su substrato di controllo e su PEDOT:PSS neutro (*Figura 5.6*), ha mostrato che nel caso del PEDOT:PSS neutro i valori dell'ampiezza di corrente sono chiaramente meno dispersi che nel caso del controllo; ciò rivela che sono presenti maggiori fluttuazioni del valore dell'ampiezza delle correnti registrate sul controllo rispetto al substrato neutro.

Il laboratorio di biofisica in cui ho sviluppato il progetto di tesi in collaborazione con il laboratorio di fisica della materia della Prof. Fraboni ha ottenuto i risultati di proliferazione delle cellule T98G in funzione dello stato di ossido-riduzione della matrice polimerica PEDOT:PSS.

Le curve di proliferazione sono state ottenute acquisendo i dati a 24h, 48h e 72h dalla semina. Le cellule sono state coltivate sul substrato della piastra multiwell e sul PEDOT:PSS neutro, ossidato e ridotto. Nella *Figura 5.7* possiamo osservare che le cellule seminate sul substrato di controllo sono significativamente in numero maggiore rispetto a quelle seminate sul substrato di PEDOT:PSS neutro, per tutti gli intervalli di tempo considerati. Dimostrando che il substrato di PEDOT:PSS influisce negativamente sulla capacità replicativa di queste cellule. In funzione di questo fatto, per estrapolare l'effetto dovuto allo stato ossido-riduttivo del substrato di PEDOT:PSS, i dati sono stati normalizzati rispetto al numero di cellule presenti in ciascun gruppo sperimentale a 24h (*Figura 5.8*).

I dati così analizzati dimostrano che il substrato di PEDOT:PSS ridotto favorisce la replicazione delle T98G rispetto, sia al controllo, che al PEDOT:PSS neutro, già dopo 48h di incubazione, nonostante la diminuzione che si osserva, entro le 24h, in termini di

adesione e di vitalità (dati non mostrati). Anche sul substrato di PEDOT:PSS ossidato le cellule aumentano significativamente la loro capacità proliferativa rispetto al neutro, ma solo a 72h, e in modo meno consistente rispetto al PEDOT:PSS ridotto.

Le correnti potassio, come descritto precedentemente, sono implicate nei processi di adesione, migrazione e proliferazione di diversi tipi cellulari. Per questo abbiamo correlato i dati ottenuti dalle registrazioni delle correnti evocate in cellule seminate, sia sul fondo della petri, che su PEDOT:PSS neutro, ridotto e ossidato, con quelli osservati negli esperimenti di proliferazione. L'informazione più rilevante riguarda lo stato ridotto del polimero studiato, infatti si osserva, che ad una forte riduzione dell'ampiezza di corrente potassio corrisponde un miglioramento nel tempo della capacità replicativa delle T98G.



# Conclusioni

Il lavoro sperimentale che ho svolto nell'ambito di questa tesi mi ha permesso di ottenere interessanti risultati sia per quanto riguarda la caratterizzazione elettrofisiologica della linea tumorale T98G, sia relativamente allo studio di supporti organici biocompatibili basati sull'utilizzo del polimero PEDOT:PSS come substrato cellulare.

Nel primo caso, grazie ad un approccio razionale e selettivo realizzato utilizzando bloccanti farmacologici dei canali potassio, è stato possibile identificare i canali BK come responsabili del maggior contributo alla corrente registrata nelle T98G. Inoltre l'approccio sperimentale ha permesso di individuare la presenza di due sotto-popolazioni distinte, con proprietà elettriche differenti. Infatti il 44% circa (Gruppo A) delle cellule registrate esprime sulla membrana cellulare, oltre ai canali BK e  $K_v1.1$ , anche un tipo di canale potassio voltaggio-dipendente classificato come  $K_v1.2$ , che non è presente nelle cellule del Gruppo B.

Il fatto che il corredo di canali ionici di membrana della linea T98G sia molto simile a quello dei fibroblasti dermici primari può avere forti implicazioni in ambito biomedico, ad esempio utilizzandoli come modello di confronto tra cellule tumorali e cellule sane nei processi di proliferazione, migrazione e motilità, in relazione alla funzionalità dei canali stessi.

Il polimero PEDOT:PSS è stato utilizzato come interfaccia tra le cellule e i dispositivi elettrici per approfondire le conoscenze riguardo la biocompatibilità, le reciproche interazioni e le implicazioni sulle funzionalità cellulari, allo scopo di utilizzarle in ambito biomedico e biotecnologico.

Dai dati descritti in precedenza possiamo infatti ipotizzare che il cambiamento delle proprietà elettriche, dovuto al processo di ossido-riduzione del polimero PEDOT:PSS, è in grado di modificare l'attività dei canali ionici di membrana. Nello specifico lo stato di ossido-riduzione potrebbe originare un'interazione di tipo elettrostatico tra le cariche presenti sul substrato e alcuni aminoacidi polari presenti nella catena polipeptidica dei canali ionici, comportando una variazione del loro stato di attivazione. I nostri dati dimostrano che l'interazione dei canali ionici con il substrato ridotto (eccesso di elettroni) e con quello ossidato (carenza di elettroni) comporta rispettivamente una diminuzione ed un aumento significativo dell'ampiezza della corrente, avvalorando l'ipotesi proposta.

Inoltre i risultati ottenuti dalle curve di proliferazione indicano che il polimero utilizzato

permette l'adesione e la replicazione cellulare, ma in modo meno efficace rispetto al substrato di controllo della petri. Tuttavia si osserva che in seguito al processo di ossido-riduzione del substrato la capacità di replicazione delle cellule cambia. In particolare, in seguito a riduzione del substrato, la popolazione cellulare acquisisce un potere proliferativo sostanzialmente maggiore rispetto al substrato ossidato, il quale risulta idoneo all'adesione, ma determina un minore tasso di proliferazione.

Questi risultati hanno permesso di dimostrare come i processi di ossido-riduzione influenzano macroscopicamente sia le correnti ioniche, che la replicazione cellulare, indipendentemente dal grado di rugosità del substrato, che infatti è il medesimo per tutti i campioni analizzati. Quindi l'unico parametro che si può identificare come responsabile di tali fenomeni è rappresentato dallo stato di ossido-riduzione del polimero.

Poiché le interazioni ioniche sono alla base di molti processi cellulari fondamentali, che vanno dalla semplice comunicazione con le cellule circostanti, al complesso processo di formazione delle metastasi tumorali, è evidente l'interesse della ricerca per questo tipo di dispositivi biocompatibili associati soprattutto allo studio dei tumori e allo sviluppo di possibili applicazioni biomediche volte a combatterli.

# Bibliografia

- [1] A. L. HODGKIN e F. HUXLEY (1952), *Currents Carried by Sodium and Potassium Ions through the Membrane of the Giant Axon of Loligo*; J. Physiol. Vol 116, pp. 449-472.
- [2] O. P. HAMILL, A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN e F. J. SIGWORTH (1981), *Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches*; Pflugers Arch 391:85-100.
- [3] G. WROBEL, R. SEIFERT, A. OFFENHAUSSER et al. (2005), *Cell-Transistor Coupling: Investigation of Potassium Currents Recorded with p- and n-Channel FETs*; Biophysical Journal Vol 89, pp. 3628-3638.
- [4] M. MARZOCCHI (2011), *Organic polymers as novel tools for biosensing applications*; Tesi di Laurea in Fisica, Università “Alma Mater Studiorum” di Bologna.
- [5] D. SADAVA, H. C. HELLER, G. H. ORIANI, W. K. PURVES e D. M. HILLIS (2009), *Elementi di biologia e genetica*; Zanichelli.
- [6] B. HILLE (2001), *Ion Channels of Excitable Membranes*; Third Edition University of Washington.
- [7] A. L. HODGKIN e F. HUXLEY (1952), *A Quantitative Description of Membrane Current and Its Application to Conduction and Excitation in Nerve*; J. Physiol. Vol 117, pp. 500-544.
- [8] D. VOET, J. G. VOET, C. W. PRATT (2007), *Fondamenti di biochimica*; Zanichelli.
- [9] A. MATHIE, J. R. A. WOOLTORTON e C. S. WATKINS (1998), *Voltage-Activated Potassium Channels in Mammalian Neurons and Their Block by Novel Pharmacological Agents*; Gen. Pharmac. Vol. 30, No. 1, pp. 13-24.
- [10] T. NARAHASHI (2008), *Tetrodotoxin: A brief history*; Proc. Jpn. Acad., Ser. B 84.
- [11] K. M. GIANGIACOMO, M. L. GARCIA e O. B. MCMANUS (1992), *Mechanism of Iberitoxin Block of the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium Channel from Bovine Aortic Smooth Muscle*; Biochemistry Vol 31, pp. 6719-6727.

- [12] A. L. HARVEY (2000), *Twenty years of dendrotoxins*; *Toxicon* Vol 39 pp. 15-26.
- [13] G. SUAREZ-KURTZ et al. (1999), *Peptidyl Inhibitors of Shaker-Type  $K_v1$  Channels Elicit Twitches in Guinea Pig Ileum by Blocking  $K_v1.1$  at Enteric Nervous System and Enhancing Acetylcholine Release*; *JPET* Vol 289, pp. 517-1522.
- [14] J. M. NERBONNE (2000), *Molecular basis of functional voltage-gated  $K^+$  channel diversity in the mammalian myocardium*; *Journal of Physiology* 525.2, pp. 285-298.
- [15] A. L. HODGKIN, A. F. HUXLEY e B. KATZ (1952), *Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo*; *J. Physiol.* Vol 116, pp. 424-448.
- [16] J. W. MOORE, M. P. BLAUSTEIN, N. C. ANDERSON e T. NARAHASHI (1967), *Basis of Tetrodotoxin's Selectivity in Blockage of Squid Axons*; *The Journal of General Physiology* Vol 50.
- [17] C. M. ARMSTRONG e B. HILLE (1972), *The Inner Quaternary Ammonium Ion Receptor in Potassium Channels of the Node of Ranvier*; *The Journal of General Physiology* Vol 59, pp. 388-400.
- [18] B. SAKMANN e E. NEHER (1984), *Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes*; *Ann. Rev. Physiol.* Vol 46, pp. 455-472.
- [19] E. GAVOCI, I. ZIRONI, D. REMONDINI, A VIRELLI et al. (2013), *ELF Magnetic Fields Tuned to Ion Parametric Resonance Conditions do not Affect TEA-Sensitive Voltage-Dependent Outward  $K^+$  Currents in a Human Neural Cell Line*; *Bioelectromagnetics*, Vol 34, pp. 579-588.
- [20] A. ELSCHNER, S. KIRCHMEYER, W. LOVENICH et al. (2011), *PEDOT: Principles and Applications of an Intrinsically Conductive Polymer*; CRC Press.
- [21] Y. WANG (2009), *Research progress on a novel conductive polymer: poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT)*; *Journal of Physics: Conference Series* 152.
- [22] J. OUYANG et al. (2004), *On the mechanism of conductivity enhancement in poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(styrene sulfonate) film through solvent treatment*; *Polymer*, Vol 45, pp. 8443-8450.
- [23] U. LANG, N. NAUJOKS, and J. DUAL (2009), *Mechanical characterization of PEDOT:PSS thin films*; *Synthetic Metals*, Vol 159, pp. 473-479.

- [24] J. Y. WONG, R. LANGER, and D.E. INGBER (1994), *Electrically conducting polymers can noninvasively control the shape and growth of mammalian cells*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(8):3201-3204.
- [25] C. SALTO (2008), *Control of neural stem cell adhesion and density by an electronic polymer surface switc*; Langmuir, Vol 24, pp. 14133-14138.
- [26] A. M. D. WAN, D. BROOKS, A. GUMUS et al. (2009), *Electrical control of cell density gradients on a conducting polymer surface*; Chem. Commun. pp. 5278-5280.
- [27] A. M. D. WAN, R. M. SCHUR et al. (2012), *Electrical Control of Protein Conformation*; Adv. Mater. Vol 24, pp. 2501-2505.
- [28] Z. C. YE, H. SONTHEIMER (1999), *Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate*; Cancer Res, Vol 59, pp. 4383-4391.
- [29] A. L. BORDEY, H. SONTHEIMER (1998), *Electrophysiological Properties of Human Astrocytic Tumor Cells In Situ: Enigma of Spiking Glial Cells*; J Neurophysiol Vol 79, pp. 2782-2793.
- [30] H. SONTHEIMER (2004), *An Unexpected Role for Ion Channels in Brain Tumor Metastasis*; Exp Biol Med, Vol 233, pp. 779-791.
- [31] A. K. WEAVER, X. LIU e H. SONTHEIMER (2004), *Role for Calcium-Activated Potassium Channels (BK) in Growth Control of Human Malignant Glioma Cells*; Journal of Neuroscience Research Vol 78, pp. 224-234.
- [32] I. ZIRONI, P. GAIBANI, D. REMONDINI et al. (2010), *Molecular remodeling of potassium channels in fibroblasts from centenarians: A marker of longevity?*; Mechanisms of Ageing and Development Vol 131, pp. 674-681.
- [33] A. M. D. WAN, A. GUMUS, J. P. CALIFANO et al. (2010), *Control of cell migration using a conducting polymer device*; Soft Matter, Vol 6, pp. 5138-5142.
- [34] B. SCHEFFLER, N. M. WALTON et al. (2005), *Phenotypic and functional characterization of adult brain neurogenesis*; PNAS Vol. 102, No. 26, pp. 9353-9358.