

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA
DELL'ENERGIA ELETTRICA E DELL'INFORMAZIONE
"GUGLIELMO MARCONI"**

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**Dispositivi biomedici avanzati
per il controllo selettivo della funzionalità
di cellule cerebrali non neuronali**

Tesi in
FISIOLOGIA

Relatore

Dott.ssa Valentina Benfenati

Presentata da

Roberta Fabbri

Correlatore

Dott.ssa Emanuela Saracino

Anno accademico 2018-2019

Sessione II

INDICE

SOMMARIO	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1. Le cellule gliali	7
1.2. Il ruolo degli astrociti: nuovi potenziali target terapeutici	13
1.2.1. Fisiologia degli astrociti	13
1.2.2. Fisiopatologia degli astrociti	28
1.3. Tecniche di indagine standard per lo studio delle funzionalità astrogliali	33
1.3.1. Elettrofisiologia.....	34
1.3.2. Micro-electrode Arrays	36
1.3.3. Calcium imaging	39
1.4. Interfacce neurali	42
1.4.1. Interfacce neurali e astrociti	46
1.4.2. Astrociti e materiali semiconduttori organici.....	48
1.4.3. Grafene	52
1.4.3.1. Il grafene come interfaccia neurale	57
1.4.3.2. Il grafene e gli astrociti	61
2. SCOPO DELLA TESI	66
3. MATERIALI E METODI	68
3.1. Colture primarie di astrociti neocorticali di ratto.....	68
3.2. Preparazione dei campioni ITO-GO	69
3.3. Sintesi e funzionalizzazione del GO	70
3.4. Test di vitalità cellulare: FDA.....	70
3.5. Calcium imaging e stimolazione elettrica	71
3.6. Analisi statistica	73
4. ANALISI DEI RISULTATI E DISCUSSIONE	74
4.1. Caratterizzazione SEM dei substrati	74
4.2. Biocompatibilità del dispositivo ITO-GO	75

4.3. La stimolazione elettrica mediante ITO-GO induce risposte di calcio in astrociti.....	78
4.4. Dispositivi ITO-GO flessibili.....	84
4.5. Discussione.....	85
5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	88
6. BIBLIOGRAFIA	90
RINGRAZIAMENTI.....	101

SOMMARIO

Gli studi compiuti negli ultimi quarant'anni, hanno evidenziato che gli astrociti, ovvero cellule non neuronali del Sistema Nervoso Centrale, pur essendo definite come cellule non eccitabili, sono attivamente coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale e nel controllo della trasmissione sinaptica. I meccanismi alla base della funzionalità degli astrociti, ed in particolare i segnali mediati da variazioni della concentrazione di calcio intracellulare, stanno pertanto emergendo come potenziale bersaglio per lo sviluppo di applicazioni tecnologiche nelle neuroscienze di base ma anche in approcci diagnostici e terapeutici innovativi in neurologia.

Fra i materiali a base di carbonio, il grafene ed i suoi derivati hanno suscitato un notevole interesse nel campo biomedico, in virtù della combinazione di proprietà meccaniche, elettriche e di biocompatibilità.

Il presente lavoro riporta lo studio dell'interazione di materiali a base di ossido di grafene (GO) con cellule astrogliali e si propone di indagare l'effetto della stimolazione elettrica operata mediante differenti dispositivi ITO-GO (ossido di grafene su ossido di indio stagno), sui segnali di $[Ca^{2+}]_i$ in colture primarie di astrociti neocorticali di ratto.

I risultati dimostrano che i substrati a base di GO e la loro funzionalizzazione con molecole alifatiche promuovono l'adesione cellulare astrogliale.

Inoltre, la stimolazione elettrica extracellulare induce differenti risposte di $[Ca^{2+}]_i$ in astrociti a seconda del dispositivo utilizzato: i) risposte oscillatorie rapide, tipiche dell'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ mediato dal rilascio di calcio dagli stores citoplasmatici erano osservate in astrociti su ITO e ITO-rGO. ii) Le cellule cresciute su dispositivi ITO-GO mostravano risposte a lento incremento di $[Ca^{2+}]_i$, caratteristiche dell'influsso di calcio extracellulare, la cui dinamica sembra dipendere dallo spessore dello strato di GO.

Si discute una possibile spiegazione biofisica del diverso comportamento evidenziando come esso possa essere legato alla differente sensibilità degli astrociti

a stimolazioni di tipo resistivo o capacitivo: si ipotizza la presenza di un effetto resistivo in ITO e ITO-rGO, mentre si suppone il prevalere di un fenomeno capacitivo in ITO-GO, con dinamiche temporali che variano all'aumentare della concentrazione e dello spessore del GO. Lo stesso comportamento è stato osservato anche su dispositivi ITO-GO e ITO-rGO fabbricati su substrati flessibili.

La possibilità qui presentata di modulare selettivamente i segnali di $[Ca^{2+}]_i$ astrogliali, utilizzando diversi dispositivi a base di grafene, pone le basi per un potenziale sviluppo di dispositivi biomedici che, in modo lungimirante ed innovativo, non mirino solo alla stimolazione dei neuroni ma anche alla modulazione della funzionalità astrogliale e che possano essere diretti alla diagnosi e terapia delle disfunzioni cerebrali quali epilessia, edema ed ictus, nonché malattia di Alzheimer e Parkinson.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le cellule gliali

Nel sistema nervoso esistono due classi principali di cellule: le cellule nervose (o neuroni) e le cellule gliali (o glia). La differenza fondamentale tra neuroni e glia sta nella loro eccitabilità elettrica.

I neuroni rappresentano le cellule elettricamente eccitabili del sistema nervoso. Sulla base della capacità di generare e propagare segnali elettrici sotto forma di potenziali d'azione, le cellule neuronali sono considerate le unità funzionali del sistema nervoso.

Le cellule gliali sono invece classificate come le cellule non eccitabili del sistema nervoso, non essendo in grado di dare origine a potenziali d'azione [Verkhatsky & Butt, 2007, Kimelberg & Nedergaard, 2010].

La dottrina del neurone, cioè il principio secondo il quale i neuroni sono i componenti elementari di trasmissione ed elaborazione dell'informazione nel sistema nervoso, proposta e supportata principalmente da Santiago Ramon y Cajal, è alla base dei moderni metodi di studio in neuroscienze.

La visione neurocentrica ha portato i neuroscienziati ad ignorare lo studio delle cellule gliali, considerate puramente cellule di sostegno del sistema nervoso. Nonostante il concetto di neuroglia apparve cinquant'anni prima della diffusione della dottrina del neurone, le cellule gliali sono state infatti largamente trascurate fino alla seconda metà del ventesimo secolo, principalmente a causa della mancanza di strumenti tecnologici adeguati che ne consentissero l'indagine morfologica e funzionale [Verkhatsky, 2006].

Il concetto di neuroglia (dal greco *cléa*, colla) fu promulgato nel 1856 da Rudolph Virchow, per indicare un "cemento nervoso", un tessuto connettivo cerebrale che riempie lo spazio fra i neuroni, contenente un certo numero di cellule.

Le prime registrazioni elettrofisiologiche su cellule gliali, eseguite dal gruppo di Stefan Kuffler nel 1964-1965, fornirono la dimostrazione che le cellule gliali

presentano proprietà elettrofisiologiche diverse dai neuroni. Mostrarono inoltre l'esistenza di un accoppiamento elettrico fra le cellule gliali identificando le strutture che collegano le reti gliali, note come giunzioni gap, e confermarono l'interazione attiva fra neuroni e glia [Kuffler & Potter, 1964]. Diversi importanti progressi tecnologici, sopraggiunti negli anni 1970 e 1980, consentirono l'utilizzo di tecniche di studio più avanzate (quali patch-clamp, indagini basate su indicatori fluorescenti di calcio, tecniche di preparazione e mantenimento di colture cellulari gliali) che risultarono fondamentali per la comprensione dell'importanza delle cellule gliali nel sistema nervoso, innescando l'era moderna della fisiologia gliale [Verkhratsky, 2006]. Nel 1984 Helmut Kettenmann e Harold Kimelberg identificarono i recettori del glutammato e del GABA in colture di astrociti e oligodendrociti. Nel 1990, Ann Cornell Bell e Steve Finkbeiner intuirono che gli astrociti sono in grado di comunicare su lunghe distanze mediante la propagazione di onde di calcio, che possono essere innescate dalla stimolazione di vari recettori di neurotrasmettitori nella membrana astrogliale. Inoltre, fu rilevato che le cellule gliali possiedono una moltitudine di canali ionici, che possono essere attivati da vari stimoli extracellulari e intracellulari. Tali scoperte cambiarono radicalmente l'immagine delle cellule gliali come cellule elettricamente silenti [Verkhratsky & Butt, 2007].

Attualmente una crescente attenzione neuroscientifica è diretta all'importanza delle cellule gliali e alla loro relazione molecolare, strutturale e funzionale con i neuroni. Gli studi degli ultimi quarant'anni hanno contribuito a consolidare l'idea che il ruolo della glia non si limita al mero concetto di collante passivo inizialmente proposto. Dati recenti dimostrano il coinvolgimento attivo delle cellule gliali nei processi di ricezione e trasmissione sinaptica e la capacità di produrre effetti importanti sull'ambiente neurochimico, con funzionalità cruciali nella fisiologia e fisiopatologia del sistema nervoso centrale [Pannasch et al., 2013, Salatino et al., 2018].

Nel sistema nervoso dei vertebrati, le cellule gliali sono da 10 a 50 volte più numerose dei neuroni [Kandel et al., 2015].

Le cellule della glia si distinguono in macroglia e microglia. La macroglia comprende gli astrociti e gli oligodendrociti (figura 1) [Verkhatsky & Butt, 2007].

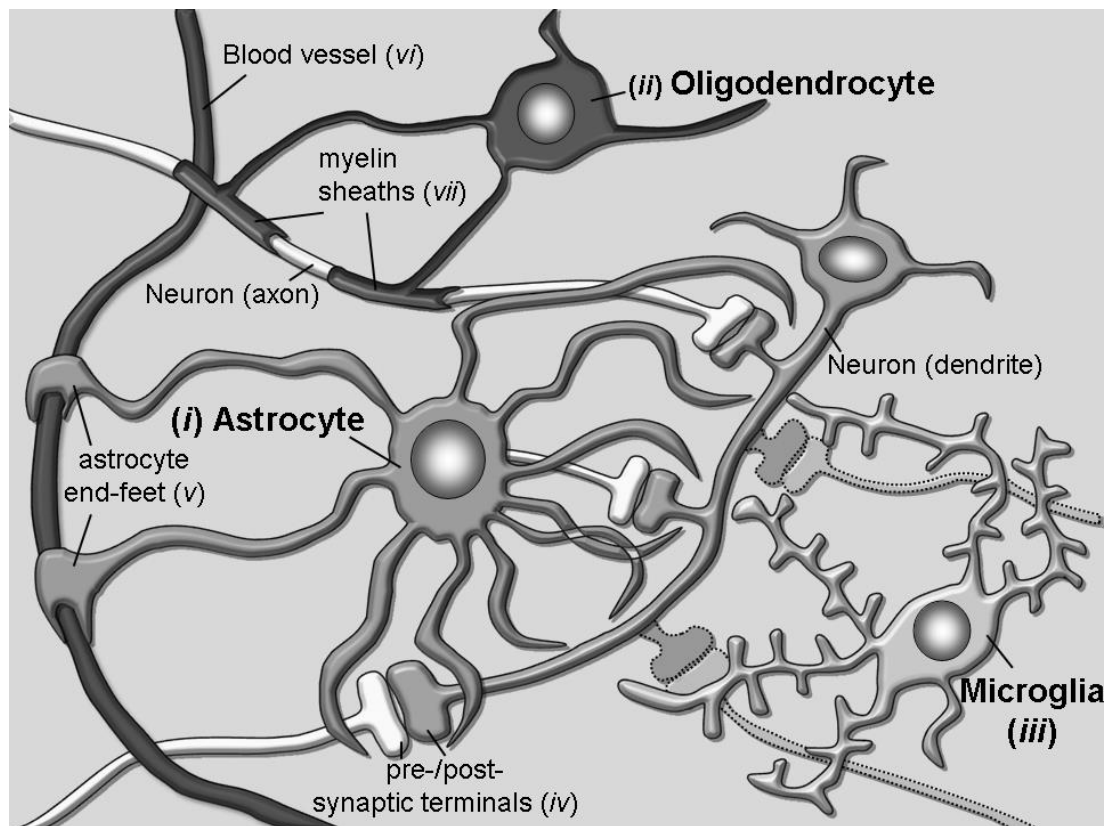


Figura 1 Rappresentazione schematica delle cellule gliali e della loro interazione con i neuroni [Di Benedetto et al., 2013].

La macroglia si sviluppa a partire dalle cellule progenitrici neuroepiteliali del sistema nervoso, che durante l'embriogenesi si trasformano in glia radiale, il tipo di cellule staminali primarie da cui originano sia i neuroni sia la macroglia. Nel neurosviluppo, la glia radiale genera infatti la maggior parte dei neuroni corticali formando un'impalcatura che aiuta la migrazione neurale, mentre un interruttore gliogenico ne promuove la differenziazione in astrociti maturi e cellule precursori degli oligodendrociti. Dopo la maturazione, la glia radiale scompare da molte regioni del cervello, sebbene rimanga nella retina e nel cervelletto.

A differenza di astrociti e oligodendrociti, che derivano dal neuro-ectoderma, la microglia ha origine mesodermica e proviene da macrofagi primitivi che migrano

verso il sistema nervoso centrale dove si stabiliscono differenziandosi in microglia [Bradley Zuchero & Barres, 2015, Allen & Lyons, 2018].

La microglia rappresenta il sistema immunitario endogeno del cervello, responsabile della difesa del sistema nervoso centrale in risposta a vari tipi di fattori patogeni.

In condizioni fisiologiche, la microglia a riposo esiste in una forma ramificata, caratterizzata da un piccolo corpo cellulare e processi lunghi e sottili che inviano più rami in tutte le direzioni. Le cellule microgliali si muovono costantemente, scansando il territorio locale per segnalare possibili lesioni del tessuto nervoso.

La presenza di un danno neuronale induce un rapido movimento dei processi microgliali verso il sito della lesione, che viene rilevato e circondato dalla microglia provocando il rilascio di fattori vascolari, neuronali o astrogliali che innescano l'attivazione della microglia. Nello stato attivato (o reattivo) la microglia presenta processi più corti e spessi ed un soma più grande. Lo stadio finale di attivazione è rappresentato da una forma "ameboide" con attività fagocitaria. La fagocitosi microgliale è fondamentale per la rimozione di detriti cellulari e cellule apoptotiche e per il rimodellamento sinaptico in condizioni fisiopatologiche [Verkhatsky & Butt, 2007, Kettenmann & Verkhatsky, 2013].

Gli oligodendrociti sono cellule gliali con pochi processi. La funzione principale degli oligodendrociti è la produzione della guaina mielinica. La mielina agisce come involucro lipidico che isola gli assoni nel sistema nervoso centrale, aumentando la velocità di conduzione del potenziale d'azione fino a 200 m/s. Gli oligodendrociti partecipano anche alla formazione dei nodi di Ranvier, siti privi di isolamento mielinico dove si rigenera l'energia del potenziale d'azione, provocando la conduzione saltatoria dell'impulso nervoso, che "salta" da un nodo all'altro. Lo stesso compito viene eseguito dalle cellule di Schwann nel sistema nervoso periferico [Kettenmann & Verkhatsky, 2013].

Gli astrociti sono le cellule gliali più numerose nel sistema nervoso centrale, dalla classica forma stellata. La complessità e la diversità delle cellule corticali astrogliali contraddistinguono il cervello umano adulto. Rispetto ad altre specie minori di

vertebrati, gli astrociti umani risultano significativamente più voluminosi ed elaborati (figura 2) [Oberheim, 2006].

Una caratteristica morfologica degli astrociti è l'espressione di filamenti intermedi che formano il citoscheletro. La principale proteina strutturale del filamento astrogliale è la proteina fibrillare acida gliale (GFAP), comunemente usata come marcatore specifico per l'identificazione immunohistochimica di astrociti [Verkhatsky & Butt, 2007].

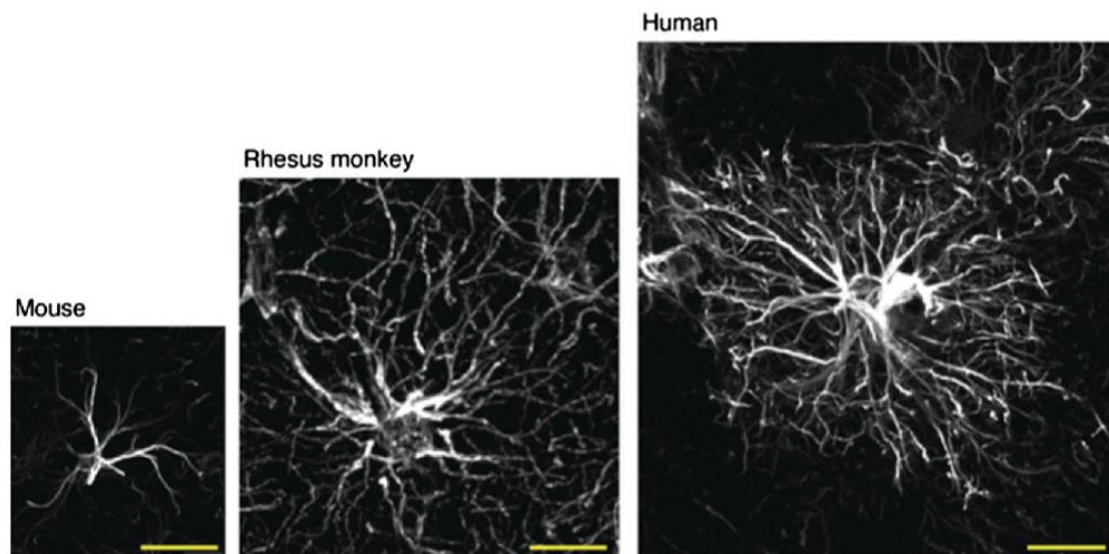


Figura 2 La dimensione degli astrociti cresce con l'aumentare della complessità delle funzioni cerebrali. Confronto di astrociti marcati con proteina gliale fibrillare acida (GFAP) nella corteccia di topo, scimmia Rhesus e del cervello umano. Scala: 50 μm . [Kimelberg & Nedergaard, 2010].

Gli astrociti si suddividono in due principali sottotipi, sulla base di differenze morfologiche, funzionali e di posizione anatomica: gli astrociti protoplasmatici e gli astrociti fibrosi.

Gli astrociti protoplasmatici sono presenti nella sostanza grigia ed occupano gli strati più profondi della corteccia (strati 2-6). Sono dotati di numerosi prolungamenti corti ed elaborati. La sovrapposizione tra cellule vicine è minima ed ogni singolo astrocita occupa un territorio ben definito, presentando un'organizzazione funzionale in domini i cui elementi (neuroni, terminali sinaptici e vasi sanguigni) entrano in contatto con i processi astrogliali (figura 3).

Gli astrociti fibrosi si trovano nella sostanza bianca e sono caratterizzati da pochi e lunghi prolungamenti. Non sono distribuiti in domini.

Studi di neuroanatomia classici e moderni indicano che entrambi i sottotipi astrogliali prendono contatto, attraverso i pedicelli, con i vasi sanguigni del sistema nervoso centrale (pedicelli perivascolari) e con la superficie piaie (contatti subpiali). Inoltre stabiliscono gap junction con gli astrociti vicini. I processi degli astrociti protoplasmatici avvolgono le sinapsi, mentre gli astrociti fibrosi inviano prolungamenti ai nodi di Ranvier degli assoni mielizzati [Sofroniew & Vinters, 2010, Oberheim et al., 2006].

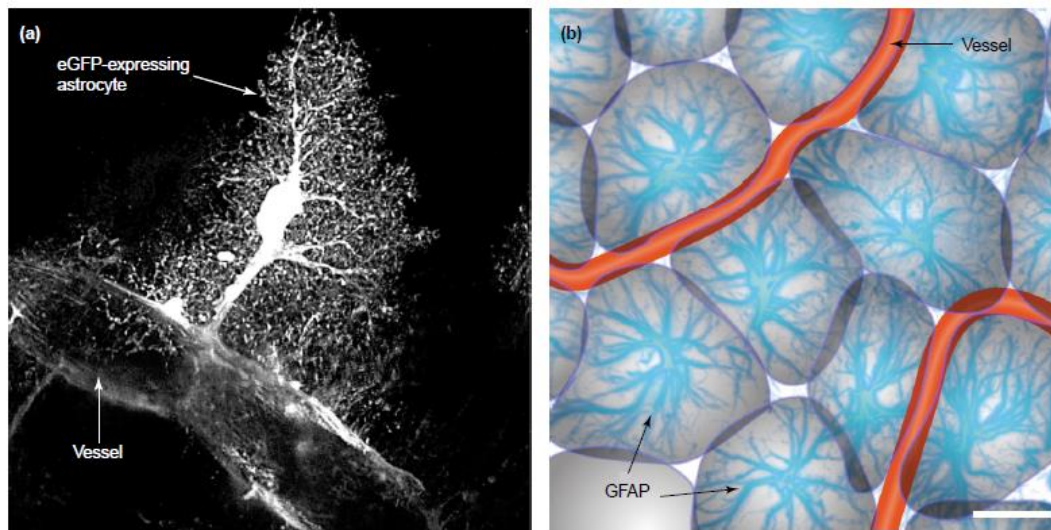


Figura 3 a) Immagine in microscopia confocale di astrocita corticale che mostra l'intimo contatto con i vasi sanguigni ed i numerosi processi che si dipartono da una singola cellula. b) La distribuzione degli astrociti in domini forma la microarchitettura della materia grigia [Nedergaard et al., 2003].

Oltre alle due tipologie principali di astrociti, l'astroglia comprende la glia radiale presente nella retina (glia di Müller) e nel cervelletto (glia di Bergmann) ed altre popolazioni più piccole di astroglia specializzata localizzate in regioni specifiche del sistema nervoso centrale (figura 4) [Verkhratsky & Butt, 2007].

L'eterogeneità dell'astroglia riflette la diversità delle funzioni che gli astrociti ricoprono nel sistema nervoso centrale.

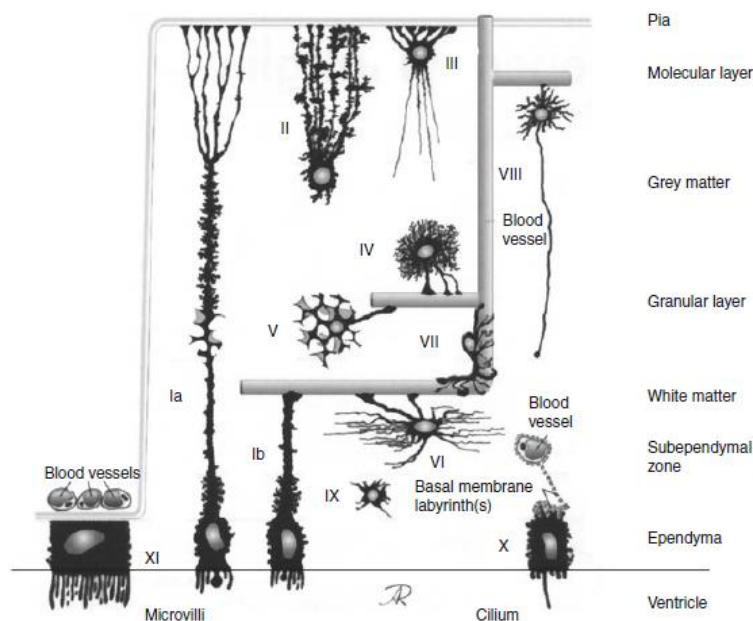


Figura 4 Tipologie morfologiche di astrociti. Ia-taniciti piali; Ib-taniciti vascolari; II-astrociti radiali (cellule gliali di Bergmann); III-astrociti marginali; IV-astrociti protoplasmatici; V-astrociti velati; VI-astrociti fibrosi; VII-astrociti perivascolari; VIII-astrociti interlaminari; IX-astrociti immaturi; X-ependimociti; XI-cellule del plesso coroideo [Verkhatsky & Butt, 2007].

1.2 Il ruolo degli astrociti: nuovi potenziali target terapeutici

Il ruolo dell'astroglia sta emergendo come nuovo potenziale target biologico nello studio e nella terapia di patologie neurologiche [Dossi et al., 2018, Seifert et al., 2006]. Gli astrociti esercitano infatti funzioni cruciali nella fisiologia e fisiopatologia del sistema nervoso centrale. Una comprensione della biologia e dell'eterogeneità morfologica e funzionale degli astrociti, così come del coinvolgimento di queste cellule nella patogenesi, può offrire il potenziale per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche volte al trattamento di neuropatologie.

1.2.1 Fisiologia degli astrociti

Gli astrociti partecipano ad una varietà di processi fisiologici nel cervello sano. Oltre a fornire un sostegno strutturale ai neuroni, essi rappresentano componenti attivi e dinamici del circuito neuronale: sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi cerebrale, contribuiscono alla formazione della barriera ematoencefalica e forniscono supporto metabolico alle cellule neuronali. Sebbene siano considerate cellule elettricamente non eccitabili, sono coinvolti nella neurotrasmissione

sinaptica, modulando l'attività neuronale mediante il rilascio di trasmettitori e segnali di calcio.

Regolazione dell'omeostasi cerebrale

Gli astrociti sono elementi chiave nel controllo dell'omeostasi cerebrale. Il mantenimento dell'omeostasi di ioni, acqua e molecole organiche (come neurotrasmettitori) è di vitale importanza per le funzionalità del sistema nervoso centrale, perché definisce l'eccitabilità neuronale ed i processi di trasmissione sinaptica.

Le concentrazioni ioniche nel tessuto nervoso non sono statiche e il loro flusso regola le funzioni nervose (figura 5). Fluttuazioni delle concentrazioni elettrolitiche nello spazio extracellulare inducono l'alterazione dell'eccitabilità delle cellule nervose, influenzando la loro capacità di generare e propagare potenziali d'azione. Il gradiente elettrochimico transmembrana generato dalle differenze di concentrazione ionica fra lo spazio intracellulare ed extracellulare costituisce la forza motrice che guida l'attività elettrica neuronale, determinando il potenziale di membrana e la soglia del potenziale d'azione. Il mantenimento dei gradienti ionici transmembrana è il compito di numerosi sistemi per il trasporto di ioni che consentono il movimento degli ioni per diffusione (canali ionici) o per trasporto attivo (pompe ioniche e scambiatori di ioni) [Verkhratsky & Nedergaard, 2018].

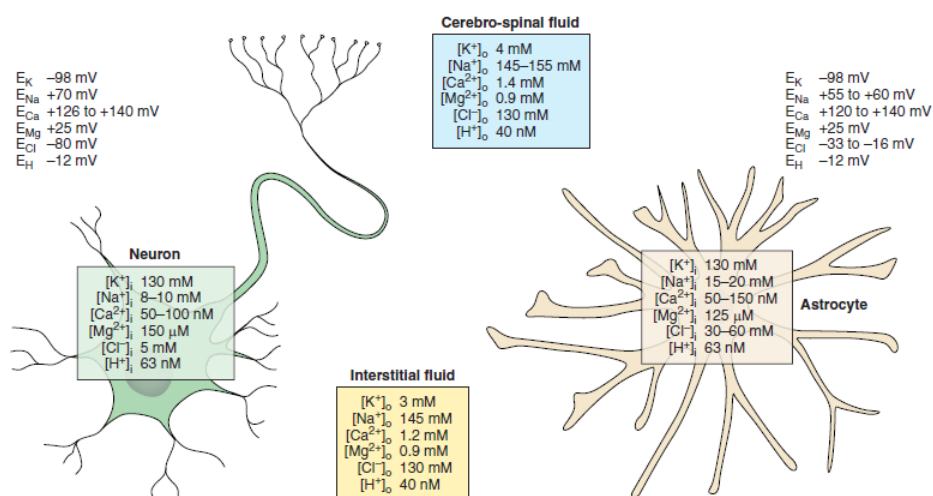


Figura 5 Distribuzione ionica e potenziali di equilibrio per differenti ioni nel liquido cerebrospinale, nello spazio interstiziale e nel citoplasma di astrociti e neuroni [Verkhratsky & Nedergaard, 2018].

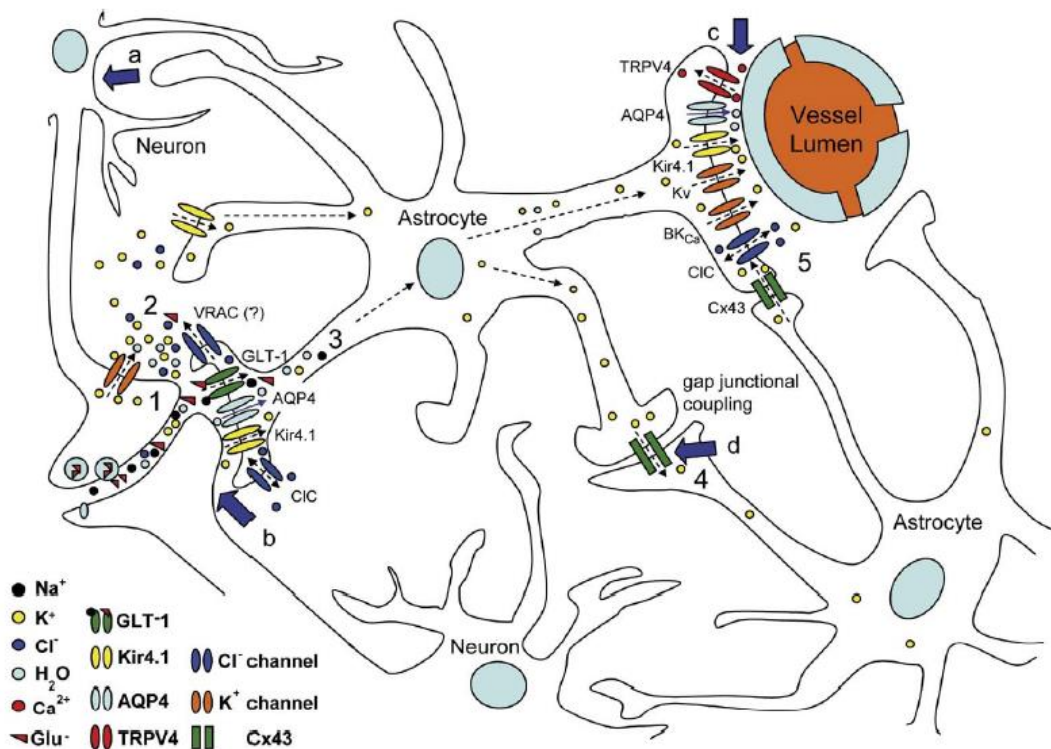


Figura 6 Meccanismi molecolari alla base delle funzioni di omeostasi cerebrale degli astrociti [Benfenati & Ferroni, 2010].

Le cellule astrogliali regolano il mantenimento dell'omeostasi ionica e chimica dell'ambiente cerebrale, attraverso i numerosi canali ionici, acquaporine e trasportatori presenti nei loro processi (figura 6) [Benfenati & Ferroni, 2010, Verkhratsky & Nedergaard, 2018].

Gli astrociti si trovano in una posizione critica per la regolazione del volume e della composizione dell'ambiente interstiziale. I processi degli astrociti avvolgono i neuroni formando l'interfaccia neurone-astrocita e prendono contatto con i vasi sanguigni all'interfaccia glio-vascolare (figura 7). All'interfaccia con i neuroni e la vascolarizzazione, gli endfeet astrogliali assorbono e rilasciano ioni, molecole organiche e acqua, fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cerebrale [Benfenati & Ferroni, 2010].

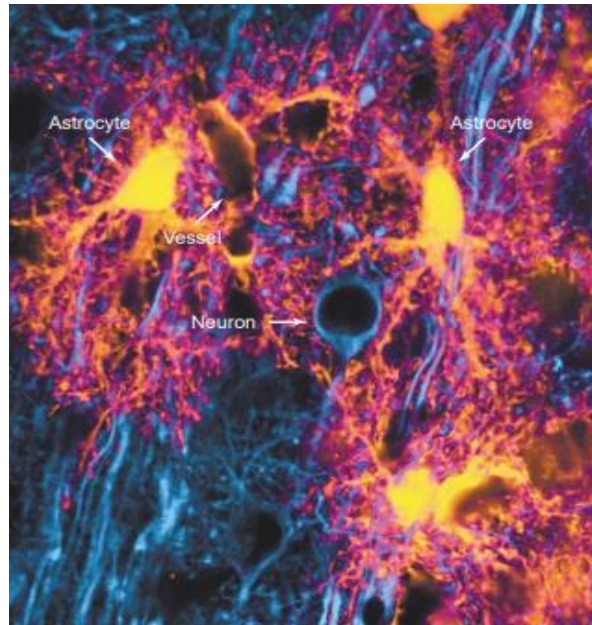


Figura 7 Organizzazione spaziale degli astrociti e dei neuroni nella corteccia [Nedergaard et al., 2003].

Lo scambio fra i microvasi sanguigni cerebrali ed il compartimento extracellulare è regolato dalla barriera ematoencefalica.

La barriera emato-encefalica è una barriera strutturale e funzionale formata da cellule endoteliali microvascolari cerebrali, astrociti e periciti. Essa ricopre una funzione di mediazione della comunicazione bidirezionale tra il microambiente del tessuto cerebrale e il sangue, controllando la concentrazione di soluti e acqua nello spazio interstiziale e proteggendo il cervello da eventuali microrganismi e tossine che circolano nel sangue [Kim, 2008]. Gli astrociti contribuiscono alla formazione e al mantenimento dell'integrità della barriera ematoencefalica (figura 8). Grazie allo stretto contatto che i peduncoli astrocitari instaurano con le cellule endoteliali dei capillari cerebrali, l'astroglia agisce come un ponte che media il flusso ed il controllo di ioni, acqua e metaboliti all'interfaccia glio-endoteliale. La presenza di un compartimento astrogliale intorno ai vasi sanguigni è di fondamentale importanza per la formazione delle cellule endoteliali, in quanto gli astrociti rilasciano diverse fattori trofici (come il fattore di crescita trasformante, TGF, e il fattore neurotrofico glia-derivato, GDNF), che inducono la formazione di tight junctions tra cellule endoteliali. Le cellule endoteliali, a loro volta, comunicano con

gli astrociti, in particolare attraverso il fattore di inibizione della leucemia (LIF), che promuove la maturazione degli astrociti [Verkhratsky & Butt, 2007].

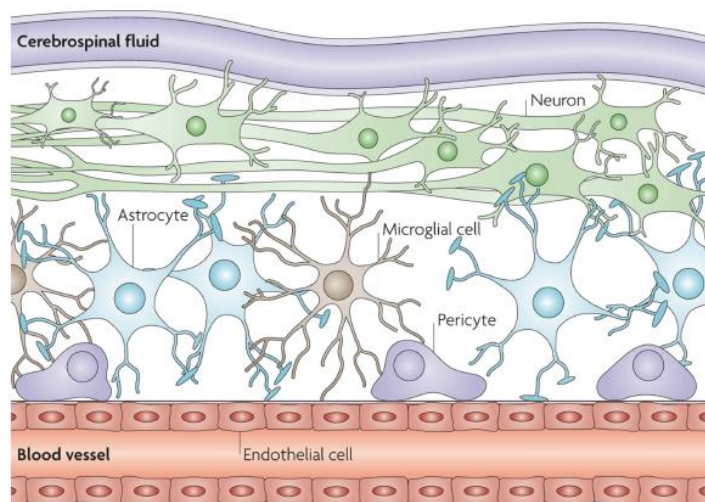


Figura 8 La barriera ematoencefalica è formata da cellule endoteliali microvascolari cerebrali, astrociti e periciti. Gli astrociti contribuiscono a mediare la comunicazione cervello-sangue [Kim, 2008].

Lo scambio all'interfaccia glio-endoteliale è mediato da recettori e canali ionici (in particolare acquaporine e canali di potassio) espressi negli endfeet astrogliali. Questi sono anche dotati di trasportatori di glucosio, che facilitano l'assorbimento del glucosio e la sua distribuzione ai neuroni. Gli astrociti contribuiscono infatti al supporto metabolico dell'attività neuronale (figura 9). Il cervello produce energia mediante l'ossidazione del glucosio, che riceve dal sangue attraverso la barriera ematoencefalica. Il glucosio rilasciato nello spazio extracellulare viene accumulato dalle cellule neurali, mediante trasportatori di glucosio presenti sulla membrana del neurone (GLUT3). Esprimendo trasportatori di glucosio (GLUT1), gli astrociti possiedono il sistema biochimico necessario a fornire il substrato energetico per i neuroni [Abbott et al., 2006]. È stato ipotizzato che questo avvenga attraverso la "via del lattato astrocita-neurone": il glucosio viene assorbito dai pedicelli perivascolari astrogliali e qui viene convertito in lattato, per essere trasportato ai neuroni come sorgente energetica. Il meccanismo di base dell'accoppiamento neurometabolico è la glicolisi aerobica innescata dal glutammato in astrociti, tale che la ricaptazione del glutammato accoppiato al sodio da parte degli astrociti e la

conseguente attivazione della pompa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasi induce l'assorbimento del glucosio e il suo processo glicolitico, che si traduce nel rilascio di lattato da parte degli astrociti [Magistretti, 2009].

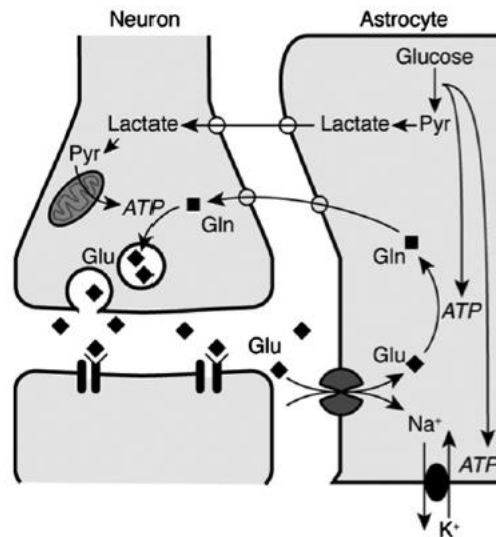


Figura 9 Schema dell'accoppiamento neurometabolico tra l'attività sinaptica e l'utilizzo di glucosio. Glu, glutammato; Gln, glutammina; Pyr, piruvato [Kimelberg & Nedergaard, 2010].

Il potenziale di membrana a riposo dell'astrocita (-90 mV), molto vicino al potenziale di equilibrio del potassio, indica l'elevata permeabilità della membrana astrogliale allo ione K^+ ed è determinata principalmente dal gradiente transmembrana del potassio. Durante l'attività neuronale, il potassio extracellulare può raggiungere livelli molto più alti del normale, a causa dell'interruzione dei meccanismi di controllo extracellulare del potassio che si verificano in condizioni patologiche. Il sistema principale che rimuove K^+ dallo spazio extracellulare si trova in astrocita. Gli astrociti aiutano infatti a prevenire l'accumulo di K^+ extracellulare $[\text{K}^+]_0$, mediante l'assorbimento locale (*K^+ uptake*) e la redistribuzione (*potassium spatial buffering*) del potassio extracellulare $[\text{K}^+]_0$ (figura 10). Tale meccanismo serve a rimuovere il potassio in eccesso nelle zone di attività neuronale e a dissiparlo su siti distali in prossimità dei vasi sanguigni, stabilizzando così l'attività sinaptica [Kimelberg & Nedergaard, 2010, Verkhratsky & Butt, 2007]. I principali canali del potassio responsabili del buffering spaziale sono i canali rettificanti entranti Kir4.1,

il tipo di canali Kir (inward rectifying K^+ channels) più comune nei processi e pedicelli di cellule astrogliali [Verkhatsky & Butt, 2007].

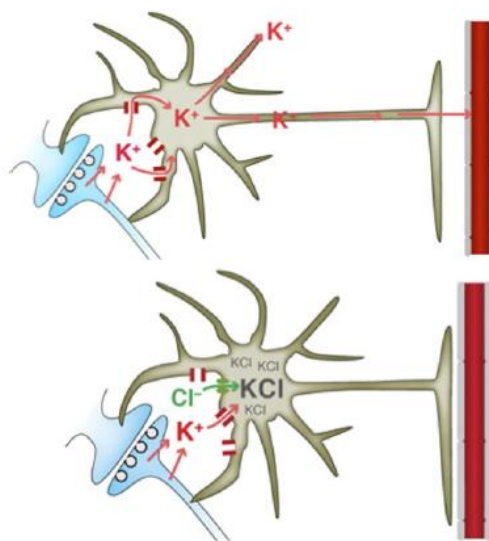


Figura 10 Rappresentazione del meccanismo del potassium buffering in astrocita. Nel primo meccanismo proposto, il potassio viene assorbito tramite la pompa Na^+/K^+ ATPasi, si diffonde mediante gap junctions e viene rilasciato lontano dal luogo di assorbimento per entrare nel flusso sanguigno locale. Nel secondo meccanismo proposto, K^+ e Cl^- vengono assorbiti in quantità equivalenti e si accumulano localmente in astrocita [Kimelberg & Nedergaard, 2010].

Il processo di omeostasi ionica degli astrociti non si limita soltanto all'equilibrio dello ione potassio, ma anche a quello degli ioni cloro e calcio. Gli astrociti contribuiscono all'omeostasi del cloro mediante l'attivazione di canali anionici. A fronte di incrementi della concentrazione citosolica di Cl^- in astrocita, l'apertura di canali anionici causa l'efflusso di Cl^- . Questo efflusso si attiva in condizioni di stress iposmotico. In alternativa gli astrociti possono accumulare Cl^- grazie a cotrasportatori $Na^+/K^+/2Cl^-$.

Le concentrazioni di calcio nel compartimento extracellulare ($[Ca^{2+}]_o$) e in particolare negli spazi perisinpatici possono fluttuare in modo sostanziale, a causa dell'accumulo di calcio intracellulare ($[Ca^{2+}]_i$) che si verifica quando un potenziale d'azione attiva i canali del Ca^{2+} . Il calcio extracellulare può scendere fino a concentrazioni al di sotto di 1 mM, che influenzano la generazione di segnali di calcio e quindi la neurotrasmissione. Il decremento di $[Ca^{2+}]_o$ fino a ~ 0.5 mM innesca segnali di calcio in astrociti, che provengono dal rilascio di calcio intracellulare guidato dai recettori $InsP3$ dagli stores del reticolo endoplasmatico. Il

calcio può lasciare l'astrocita attraverso pompe del Ca^{2+} o scambiatori $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, ripristinando la $[\text{Ca}^{2+}]_o$.

Inoltre gli astrociti regolano il pH extracellulare (pH_o) attraverso l'uptake di ioni H^+ ed il rilascio di ioni HCO_3^- nell'ambiente extracellulare. Il pH extracellulare varia fra 7.1 e 7.3, mentre il pH intracellulare in neuroni e glia è compreso fra 6.8 e 7.5. Il mantenimento del pH extracellulare è fisiologicamente importante perché anche piccole fluttuazioni di pH_o modificano significativamente la trasmissione sinaptica e l'eccitabilità neuronale [Verkhratsky & Butt, 2007].

Gli astrociti sono ricchi di acquaporine, canali per il trasporto dell'acqua, concentrati soprattutto negli endfeet perivascolari e subpiali. In particolare, tre membri della famiglia delle acquaporine sono espressi in astrocita: AQP1, AQP4 e AQP9. Di questi il canale AQP4 è il canale predominante. Esso è coinvolto nella regolazione della concentrazione e del volume dell'ambiente extracellulare e nel potassium spatial buffering, come partner molecolare del Kir4.1 per facilitare il movimento dell'acqua attraverso la membrana plasmatica (Nagelhus et al., 2004, Benfenati & Ferroni, 2010).

Infine l'astroglia è fondamentale per il ricambio dei neurotrasmettitori nel cervello. Gli astrociti si occupano di rimuovere e inattivare, attraverso processi di accumulo e conversione metabolica, neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale come glutammato (il principale neurotrasmettitore eccitatorio), GABA (il principale neurotrasmettitore inibitorio), adenosina e norepinefrina. Inoltre producono glutamina, un precursore di glutammato e GABA, che è indispensabile per la neurotrasmissione sia eccitatoria sia inibitoria [Verkhratsky & Nedergaard, 2018].

Modulazione della trasmissione sinaptica

Gli astrociti esprimono canali del potassio e del sodio che consentono il flusso di correnti ioniche, ma, a differenza dei neuroni, non sono in grado di innescare né propagare potenziali d'azione [Nedergaard et al., 2003, Sofroniew & Vinters, 2010]. Tuttavia essi mostrano segnali dinamici che consentono loro di percepire l'attività neuronale mediante canali ionici, recettori di neurotrasmettitori e trasportatori, e di

modulare l'attività di neuroni ed astrociti vicini mediante il rilascio di gliotrasmettitori, innescato da incrementi di calcio intracellulare [Pannasch & Rouach, 2013].

Numerose evidenze supportano il ruolo attivo degli astrociti nella neurotrasmissione sinaptica, introducendo l'astrocita come terzo elemento della sinapsi, denominata "sinapsi tripartita" (figura 11) [Pannasch & Rouach, 2013, Newmann, 2003, Araque et al., 1999].

Il terminale presinaptico ed il neurone postsinaptico sono tradizionalmente considerati i due elementi funzionali della sinapsi. Le ricerche degli ultimi quarant'anni hanno dimostrato l'esistenza di una comunicazione bidirezionale fra la glia perisinaptica e gli elementi neuronali della sinapsi [Pannasch & Rouach, 2013].

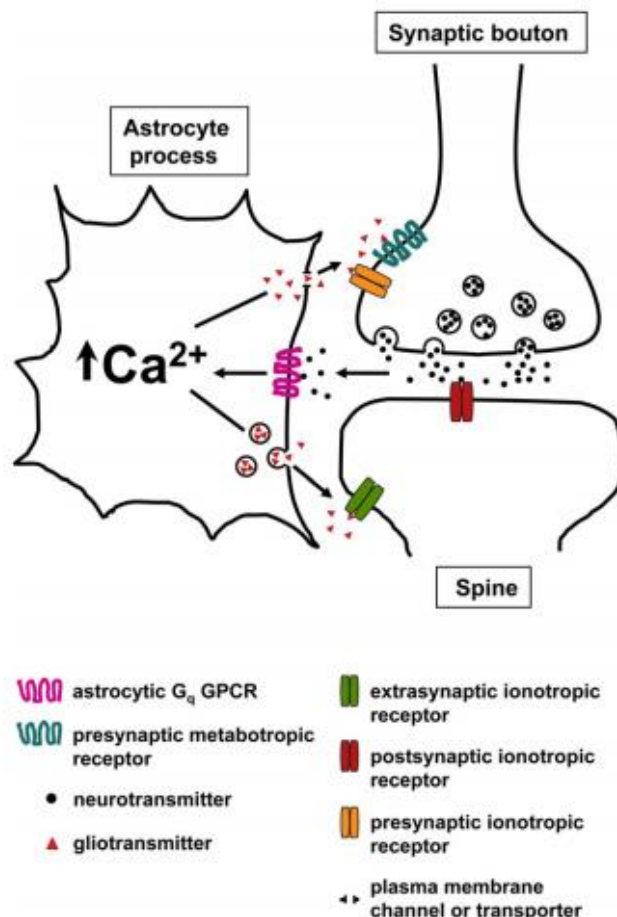


Figura 11 La sinapsi tripartita. I neurotrasmettitori rilasciati dai terminali presinaptici agiscono su recettori postsinaptici e recettori accoppiati a preteine G (GPCR) astrocitici. Gli incrementi di $[Ca^{2+}]_i$ possono innescare il rilascio di gliotrasmettitori da parte degli astrociti, che possono attivare i recettori neuronali presinaptici o postsinaptici [Agulhon et al., 2008].

Il rilascio di neurotrasmettitori nella fessura sinaptica dal neurone presinaptico, non stimola solo il neurone postsinaptico ma attiva anche la glia perisinaptica. La glia perisinaptica a sua volta risponde all'attività neuronale con un aumento di calcio intracellulare e rilascia sostanze neuroattive, i gliotrasmettitori, che possono direttamente stimolare il neurone postsinaptico e agire sul neurone presinaptico, favorendo o inibendo il rilascio di neurotrasmettitori. In questo modo, la glia perisinaptica partecipa come componente funzionale nella trasmissione sinaptica, regolando e modulando la trasmissione dei segnali elettrici cerebrali. Pertanto il concetto di sinapsi bipartita è stato superato da quello di sinapsi tripartita [Newmann, 2003].

Gli astrociti esprimono una varietà di recettori di neurotrasmettitori, fra cui recettori per glutammato, GABA, adrenalina, ATP, serotonina, acetilcolina, e diversi peptidi. L'attivazione di questi recettori evoca segnali di calcio astrogliale che inducono il rilascio di gliotrasmettitori, quali ATP, GABA, glutammato, D-serina, e lattato [Pannasch & Rouach, 2013].

La regolazione gliale della trasmissione sinaptica è stata caratterizzata sia *in vitro* (in co-culture di astrociti e neuroni) [Araque et al., 1998, Parpura et al., 1994], che *in situ* [Araque et al., 2002] dimostrando che gli incrementi di $[Ca^{2+}]_i$ possono essere evocati in astrociti da differenti stimoli, inclusi stimoli elettrici e meccanici (figura 12) [Newmann, 2003].

Sebbene gli astrociti siano considerate le cellule elettricamente non eccitabili del cervello, la capacità di rispondere a differenti stimoli chimico-fisici extracellulari (neurotrasmettitori, temperatura, gradiente osmotico, stimoli meccanici ed elettrici), partecipando attivamente alla neurotrasmissione sinaptica, conferisce all'astroglia una propria forma di eccitabilità [Navarrete et al., 2013, Scemes & Giaume, 2006].

Tuttavia in questo contesto sono ancora scarse le evidenze a riguardo dei meccanismi che sottendono la risposta degli astrociti a stimoli fisici quali ad esempio gli ultrasuoni [Shi et al., 2013], la luce o il campo elettrico [Borrachero-Conejo et al., 2019].

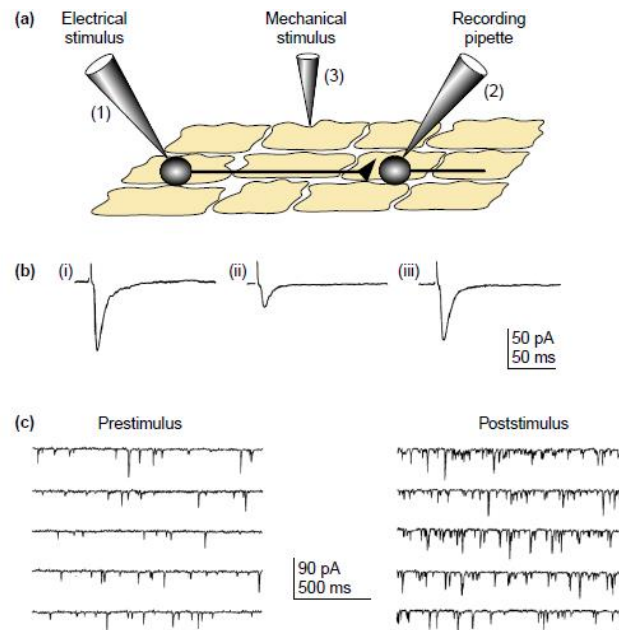


Figura 12 Regolazione gliale della trasmissione sinaptica in co-culture di astrociti e neuroni. a) Preparazione della coltura glio-neuronale. (1) Stimolazione del neurone presinaptico con impulsi elettrici; (2) registrazione delle correnti sinaptiche dal neurone postsinaptico; (3) attivazione degli astrociti sottostanti i neuroni mediante uno stimolo meccanico. b) La stimolazione del neurone presinaptico evoca una corrente eccitatoria postsinaptica (EPSC) nel neurone postsinaptico (i). La stimolazione simultanea di un astrocita adiacente riduce l'ampiezza dell'EPSC (ii). Dopo l'interruzione della stimolazione gliale, si ha il recupero della trasmissione sinaptica (iii). c) EPSC spontanei registrati da un neurone (prestimulus). La frequenza degli EPSC aumenta dopo la stimolazione di un astrocita vicino (poststimulus) [Newmann, 2003].

Segnali di calcio astrogliali

Il concetto di eccitabilità gliale è stato introdotto in seguito a una serie di studi *in vitro* [Cornell- Bell et al., 1990], *in situ* [Navarrete et al., 2013] e *in vivo* [Kuga et al., 2011], che hanno dimostrato che la stimolazione chimica o meccanica degli astrociti induce variazioni nella concentrazione di calcio intracellulare, sotto forma di oscillazioni [Verkhratsky & Nedergaard, 2018, Pannasch & Rouach, 2013].

Gli astrociti esprimono una varietà di canali ionici e recettori di membrana mediante i quali rispondono all'attività neuronale, modificando il proprio potenziale di membrana e/o innescando variazioni di calcio intracellulare [Barres et al., 1990].

I primi dati ottenuti da Cornell- Bell et al. (1990) e Charles et al. (1991) indicano che gli astrociti non solo sono in grado di rispondere a stimoli esterni con incrementi di calcio intracellulare, ma possono trasmettere questi segnali di calcio ad astrociti adiacenti (figura 13). La presenza di questo fenomeno indica che le reti di astrociti

costituiscono un via extraneuronale per la trasmissione a lunga distanza dei segnali cerebrali [Cornell- Bell et al., 1990, Charles et al. 1991].

Pertanto si evince che i segnali di calcio astrogliali svolgono un ruolo cruciale, non solo nell'omeostasi cerebrale, ma anche nella trasmissione e nell'elaborazione dell'informazione nel sistema nervoso centrale [Scemes & Giaume, 2006].

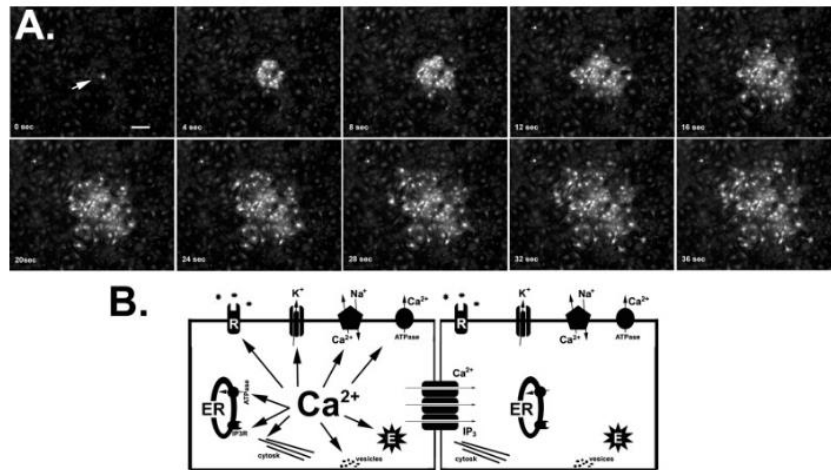


Figura 13 Onde di calcio intercellulari e loro bersagli intracellulari. A) Trasmissione di segnali di Ca^{2+} intercellulari in astrociti in coltura caricati con Fluo-3-AM. La stimolazione di una singola cellula induce un incremento di calcio intracellulare, che è seguito da segnali di calcio negli astrociti vicini. Scala: 50 μm . B) Principali bersagli intracellulari delle fluttuazioni citosoliche di Ca^{2+} negli astrociti. L'aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} ha effetto su diverse proteine della membrana plasmatica e sui recettori dell'inositolo trifosfato che si trovano nel reticolo endoplasmatico. L'inositolo trifosfato liberato agisce come secondo messaggero nella propagazione dell'onda di calcio all'astrocita adiacente, mediante gap junctions [Scemes & Giaume, 2006].

Un'onda di calcio è definita come un aumento locale della concentrazione di calcio citosolico, seguito da una successione di eventi simili aventi andamento ondulatorio [Scemes & Giaume, 2006].

Le onde di calcio possono essere limitate ad una singola cellula (onde intracellulari) o trasmesse agli astrociti vicini attraverso gap junctions. (onde intercellulari) [Volterra et al., 2014]. Le giunzioni gap sono matrici di canali transmembrana che collegano il citoplasma di due cellule adiacenti e quindi forniscono una via di diffusione diretta tra le cellule. Esse sono formate da due unità chiamate connessioni, costituiti a loro volta da glicoproteine transmembrana dette connesine. La propagazione di onde di calcio da un'astrocita all'altro dipende dal rilascio di

gliotrasmettitori, fra i quali l'adenosina trifosfato (ATP) e il glutammato [Leybaert & Sanderson, 2012].

Differenti dinamiche di calcio si verificano in distretti distinti della cellula (figura 14). I segnali generati nei processi astrogliali si sviluppano indipendentemente dai segnali che originano nel soma, mostrando profili cinetici differenti. I transienti risultano più ampi e lenti nel soma, mentre nei processi sono più veloci e più frequenti. I segnali di calcio localizzati negli endfeet si sviluppano in microdomini, in risposta all'attività neuronale [Kanemaru et al., 2014].

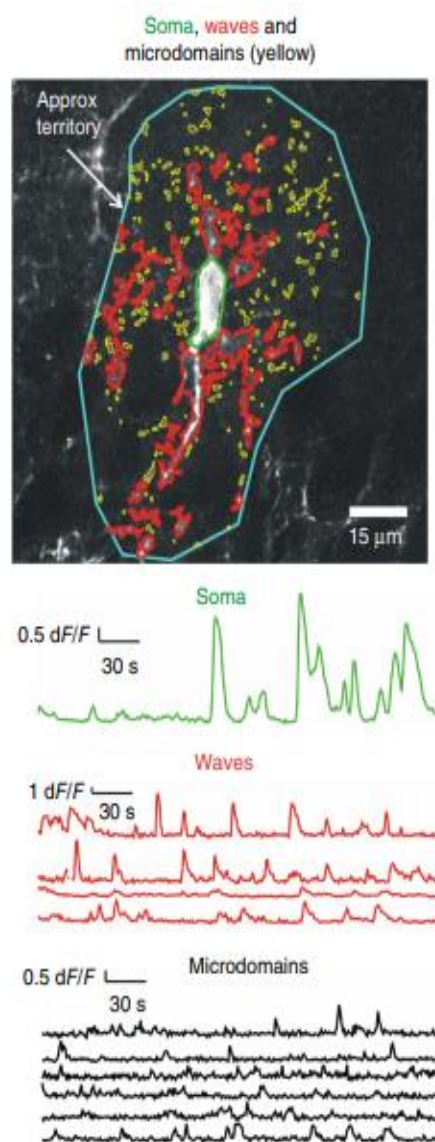


Figura 14 Oscillazioni di calcio in astroцитi ipocampali di topo: oscillazioni nel soma (verde), propagazione di onde di calcio (rosso), oscillazioni nei microdomini (giallo) [Srinivasan et al., 2015].

La distribuzione spaziale dei segnali di calcio suggerisce che diverse vie molecolari sono coinvolte in diverse parti degli astrociti. I principali compartimenti intracellulari che partecipano alla ricezione e trasmissione dei segnali di calcio sono tre: il citoplasma, il reticolo endoplasmatico (ER) e i mitocondri (figura 15). Essi presentano canali e trasportatori di membrana per lo ione calcio, le cui caratteristiche determinano l'impatto sulla forma dell'onda [Verkhratsky et al., 2012]. L'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ può essere causato dall'ingresso di calcio dallo spazio extracellulare o mediante la mobilitazione di calcio immagazzinato nel reticolo endoplasmatico.

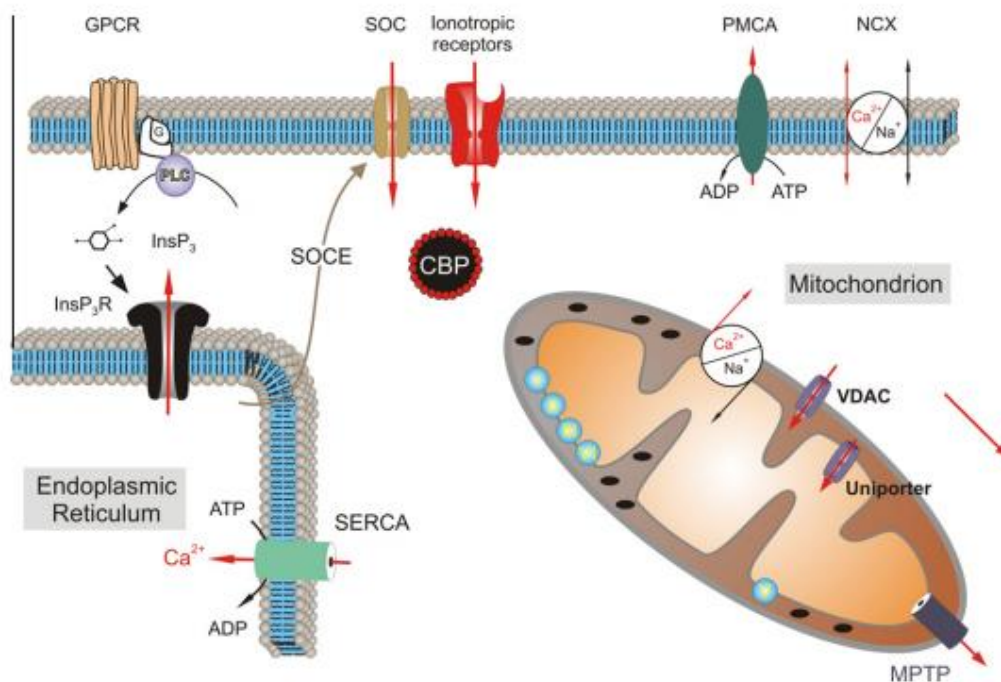


Figura 15 Meccanismo molecolare alla base dei segnali di calcio astrogliali. L'accumulo di $[Ca^{2+}]_i$ può essere causato dall'entrata di calcio dallo spazio extracellulare, attraverso recettori ionotropici o store-operated channels (SOC). Pompe Ca^{2+} /ATP-asi (PMCA) presenti nel plasmalemma possono rimuovere calcio citosolico, mentre scambiatori sodio-calcio (NCX) possono operare in entrambe le direzioni in base alla $[Na^+]_i$. Un'ulteriore sorgente di Ca^{2+} è fornita dal reticolo endoplasmatico (ER). Il rilascio di calcio dal ER è mediato dall' $InsP_3$, dopo l'attivazione di recettori metabotropici. L'attività della pompa SERCA (ATPasi del reticolo sarco-endoplasmatico dello ione calcio) ripristina il calcio negli stores del ER. L'assorbimento mitocondriale di calcio avviene attraverso canali anionici a dipendenza di voltaggio (VDAC) o sistemi di uniporto, mentre l'espulsione è mediata dallo scambiatore sodio-calcio o l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (MPTP) [Verkhratsky et al., 2012].

Uno dei meccanismi di base ad indurre le onde intracellulari di calcio negli astrociti prevede l'attivazione di recettori metabotropici accoppiati a proteine G (GPCR). Questi recettori guidano l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e la produzione di

inositolo 1,4,5-trisfosfato (InsP3), ottenuto dall'idrolisi della PCL. L'InsP3, una volta prodotto, lega ed attiva il recettore dell'inositolo trifosfato (InsP3R), una proteina canale che si trova sulla membrana del ER. Il legame InsP3-InsP3R permette l'apertura del canale e causa il rilascio di Ca^{2+} dal ER che fluisce nel citoplasma. Anche il meccanismo Calcium-Induced-Calcium-Released (CICR) contribuisce ad aumentare il rilascio del calcio nel citoplasma delle cellule, mediante un feedback-positivo, che attiva l'efflusso di calcio indotto dall'aumento di calcio citosolico [Scemes & Giaume, 2006, Verkhratsky & Nedergaard, 2018].

Gli astrociti esprimono anche recettori ionotropici e canali ionici in grado di mediare l'ingresso di Ca^{2+} dall'esterno (figura 15). L'influsso di calcio dall'ambiente extracellulare avviene ad esempio attraverso il recettore purinergico P2X7 e attraverso i membri della famiglia Transient receptor potential channels (TRP). I canali TRP sono canali ionici permeabili a più cationi (inclusi calcio, sodio e magnesio), che possono essere attivati da un'ampia varietà di stimoli di tipo chimico-fisico contribuendo a differenti funzioni fisiologiche come chemocezione, nocicezione, sensazione termica e tattile. In particolare, i canali TRPV4 e TRPA1 sono i principali espressi in astrociti.

Il canale TRPV4 (Transient receptor potential channels vanilloid 4), appartenente alla famiglia di canali TRP vanilloidi, è sensibile a stimoli chimici, termici, nocivi e di pressione osmotica. Gli astrociti nella corteccia e nell'ippocampo esprimono canali TRPV4 (localizzati principalmente nei loro processi) che sono coinvolti nella percezione della pressione osmotica e, insieme alle acquaporine (AQP), sono fondamentali per regolazione del volume cellulare [Benfenati et al., 2007]. I canali TRPV4 infatti possono essere attivati da stress iposmotico che innesca l'ingresso di calcio nella cellula, ed interagendo con AQP4, contribuiscono alla riduzione del volume cellulare [Verkhratsky et al., 2014, Benfenati et al., 2007, Benfenati & Ferroni, 2010]. Il canale TRPA1 (Transient receptor potential channels ankyrin 1) è attivato da sostanze irritanti ambientali e fattori pro-infiammatori che danno origine a modalità somatosensoriali di nocicezione.

I segnali di aumento di calcio intracellulare sono caratterizzati da differenti dinamiche temporali, in base alla sorgente extracellulare o intracellulare da cui proviene il flusso di calcio (figure 16, 17). Risultano più lenti quando l'aumento di calcio intracellulare è dovuto all'entrata di calcio dall'esterno, più veloci quando l'aumento di calcio intracellulare dipende dal rilascio di calcio da parte dei depositi citoplasmatici [Bazargani & Attwell, 2016].

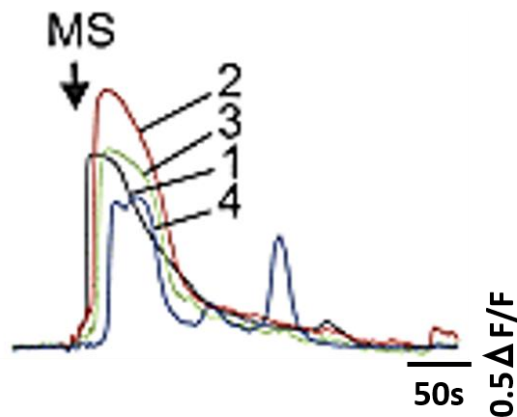


Figura 16 Segnali di aumento di calcio intracellulare mediati dall'influsso di calcio dal compartimento extracellulare [Bazargani & Attwell, 2016].

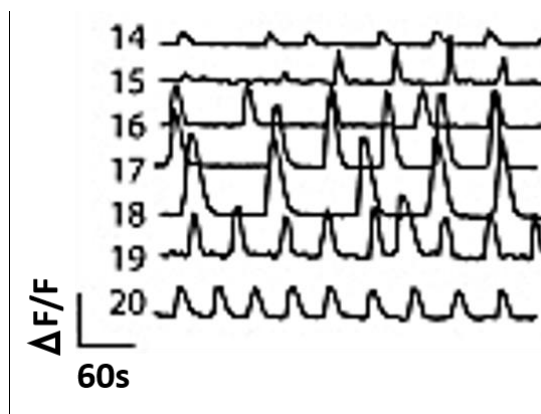


Figura 17 Segnali di aumento di calcio intracellulare indotto dall'efflusso di calcio dai depositi citoplasmatici [Bazargani & Attwell, 2016].

1.2.2 Fisiopatologia degli astrociti

Gli astrociti assumono un ruolo fondamentale in molte condizioni patologiche del sistema nervoso centrale. Analisi di tessuti cerebrali umani most-mortem e modelli animali di malattie del SNC hanno dimostrato che le disfunzioni astrogliali contribuiscono alla patogenesi di diversi disturbi neurologici e psichiatrici. [Dossi et al., 2018, Montgomery, 1994].

Gli astrociti rispondono a differenti condizioni di degenerazione e necrosi neuronale attraverso reazioni difensive che inducono alterazioni della morfologia e delle proprietà bioelettriche e fisiologiche astrogliali (figura 18) [Seifert et al., 2006, Montgomery, 1994].

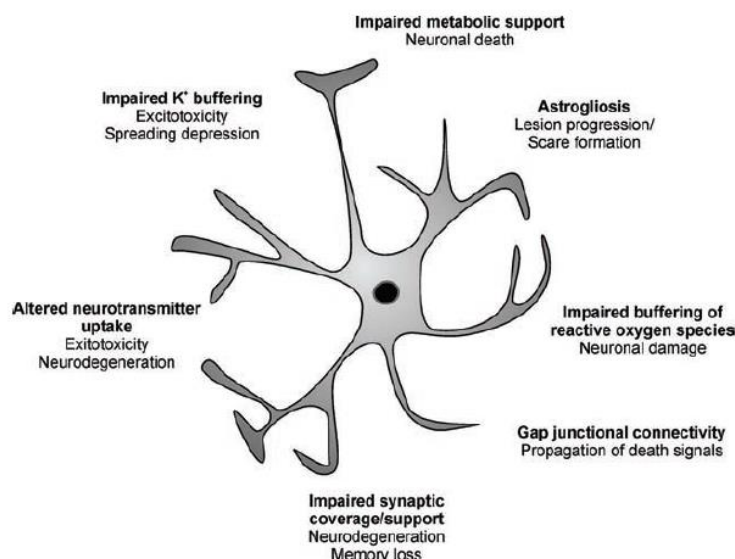


Figura 18 Il potenziale patologico degli astrociti [Chavàtal et al., 2008].

In tutti i tipi di patologie cerebrali, indipendentemente dall'etiologia, gli astrociti innescano un complesso meccanismo di risposta definita astrogliosi reattiva, che si manifesta attraverso l'ipertrofia e la proliferazione degli astrociti, e comporta alterazioni nell'espressione proteica. Per esempio l'espressione della GFAP risulta aumentata nell'astrogliosi [Dossi et al., 2018, Halassa et al., 2007]

Nello specifico, la reazione astrogliotica è volta all'isolamento dell'area danneggiata dal resto del tessuto cerebrale, alla ricostruzione della barriera emato-encefalica, e al rimodellamento dei circuiti neuronali nelle aree circostanti alla regione lesa [Chavàtal et al., 2008]. Questi compiti sono risolti in due modi distinti: la reazione di astrociti localizzati in prossimità della lesione primaria è molto diversa da quella delle cellule astrogliali distanti dalla lesione (figura 19).

Gli astrociti situati immediatamente intorno alla zona danneggiata vanno incontro ad ipertrofia e proliferazione, fino a sostituire completamente l'architettura del tessuto esistente con una cicatrice gliale permanente intorno all'area necrotica.

In aree più distanti dal sito della lesione o in forme traumatiche più lievi, i cambiamenti reattivi sono molto più moderati e non distorcono l'architettura del tessuto nervoso, ma piuttosto rilasciano fattori di crescita e facilitano la sinaptogenesi ed il rimodellamento della rete neuronale.

I segnali primari, che innescano entrambe le forme di astrogliosi, derivano da cellule danneggiate nel nucleo della lesione, e sono rappresentati da neurotrasmettitori (soprattutto glutammato e ATP), citochine, molecole di adesione, fattori di crescita e fattori ematici. La combinazione di questi "segnali dannosi" determina il tipo di astrogliosi reattiva in diverse regioni circostanti la lesione [Verkhatsky & Butt, 2007, Dossi et al., 2018].

L'astrogliosi è alla base di patologie quali epilessia, tumori cerebrali e malattia di Alzheimer (figura 20).

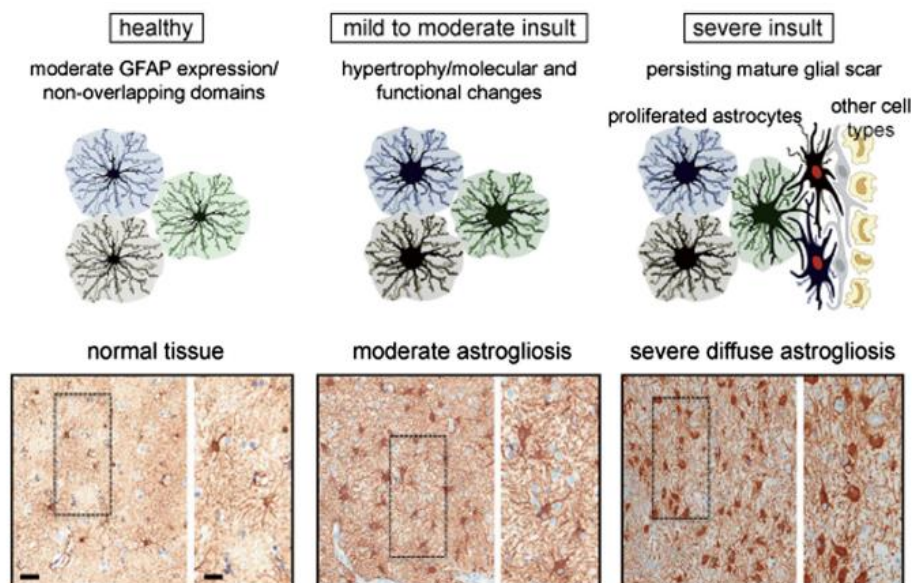


Figura 19 Forme di astrogliosi reattiva nel cervello umano, a seconda della gravità della lesione [Dossi et al., 2018].

Malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer (AD) è la principale causa di demenza senile. Si stima che il 60-80% dei casi di demenza senile sia dovuto alla AD (Wortmann et al., 2012).

La AD è caratterizzata dalla rapida compromissione della memoria episodica, a cui segue un grave declino delle funzioni cognitive, come la perdita della memoria a

lungo termine, del linguaggio, dell'attenzione e cambiamenti di personalità. Le caratteristiche istologiche della DA sono rappresentate dalla formazione di depositi di proteina beta-amiloide ($A\beta$) nelle pareti dei vasi sanguigni, che porta all'accumulo di placche amiloidi nella materia grigia e di anomali grovigli intraneuronali di filamenti di proteina Tau [Verkhatsky & Butt, 2007].

Il coinvolgimento degli astrociti nella patogenesi della AD ha cominciato ad essere considerato dopo che è stata scoperta la stretta associazione fra cellule gliali e neuroni danneggiati. Studi successivi su tessuti umani e modelli animali di AD hanno confermato l'espressione di ipertrofia astrocitaria in prossimità delle placche amiloidi, mostrando l'esistenza di una correlazione fra l'espressione di GFAP e la progressione della AD.

Una possibile spiegazione del ruolo degli astrociti nella progressione della AD può essere la seguente. Nella fase iniziale della malattia, i neuroni iniziano a sovra produrre proteina $A\beta$, che provoca la degenerazione dei dendriti. Il rilascio di prodotti neuronali innesca l'attivazione degli astrociti, che possono estendere i loro processi verso i depositi di proteina $A\beta$, rilevandoli ed entrando in contatto con il neurone danneggiato. Quindi circondano il neurone compromesso ed eliminano i detriti neuronali per poi assorbire e degradare la placca amiloide (figura 20 d) [Verkhatsky & Butt, 2007, Dossi et al., 2018].

Durante la progressione dell'AD, gli astrociti mostrano un complesso pattern di alterazioni, che interessano il citoscheletro, le giunzioni comunicanti, il buffering del potassio e l'omeostasi di neurotrasmettitori (GABA e glutammato) [Dossi et al., 2018].

Epilessia

L'epilessia è una delle malattie neurologiche più diffuse, che colpisce circa l'1% della popolazione mondiale (Organizzazione Mondiale della Sanità, 2016, <http://www.who.int/en/>). L'epilessia è caratterizzata da crisi epilettiche ripetute, cioè perturbazioni transitorie della funzione neuronale, associate ad anomalie comportamentali motorie e disturbi della coscienza, che possono danneggiare il

cervello sano o incrementare deficit neurologici preesistenti. I risultati raccolti negli ultimi vent'anni suggeriscono che alterazioni nel funzionamento astrogliale possono essere alla base della generazione e diffusione delle crisi epilettiche (figura 20 b). L'astrogliosi reattiva caratterizza tutte le forme di epilessia, ma risulta evidente in particolare nella sclerosi ippocampale, la condizione neuropatologica più comune riscontrata nell'epilessia del lobo temporale mediale (MTLE). La MTLE è caratterizzata dalla perdita di neuroni piramidali ippocampali (CA1 e CA3) ed è ampiamente indagata nel campo astrogliale. È stato osservato che gli astrociti proliferano nelle regioni in cui si verifica la degenerazione neuronale, aumentando la sovrapposizione dei loro processi [Sofroniew & Vinters, 2010], mentre cambiamenti nell'attività di canali e recettori astrogliali suggeriscono la possibile partecipazione degli astrociti all'ipereccitazione e alla diffusione degli eventi epilettici [Dossi et al., 2018]. Indagini condotte su campioni di tessuto cerebrale di pazienti epilettici hanno rivelato alterazioni nell'espressione, localizzazione e funzionalità di diverse proteine astrogliali come i canali Kir 4.1 e AQP4 ed i trasportatori di glutammato e GABA, dimostrando come le disfunzioni astrogliali siano associate ai processi di epilettogenesi e possano essere considerate come target alternativi per lo sviluppo di nuovi farmaci antiepilettici [Dossi et al., 2018].

Tumori cerebrali

I gliomi rappresentano la principale forma di tumori cerebrali primari che originano da cellule gliali e sono una delle neoplasie più aggressive, in grado di infiltrarsi nel cervello, diffondersi e crescere (figura 20 c). In particolare, gli astrocitomi, gliomi derivanti da astrociti, sono il sottotipo più comune di gliomi cerebrali. Diversi studi hanno identificato cambiamenti funzionali degli astrociti negli astrocitomi, in relazione soprattutto ai livelli di glutammato extracellulari e alle funzioni dei canali di membrana. Nelle aree tumorali e peritumorali le concentrazioni di glutammato risultano aumentate, la funzionalità di canali a voltaggio dipendenti alterata e la comunicazione intercellulare mediata da gap junctions ridotta.

Da studi su resezioni di tessuti umani, è stato riscontrato che la sovraespressione di GFAP correla positivamente con la presenza di glioma, ragione per cui la GFAP è utilizzata come marcatore immunostochimico per verificare l'origine astrocitaria del tumore gliale. Cambiamenti nell'espressione di altre proteine strutturali dei filamenti intermedi, come cheratina e vimentina, sono collegati al grado di malignità degli astrocitomi [Dossi et al., 2018].

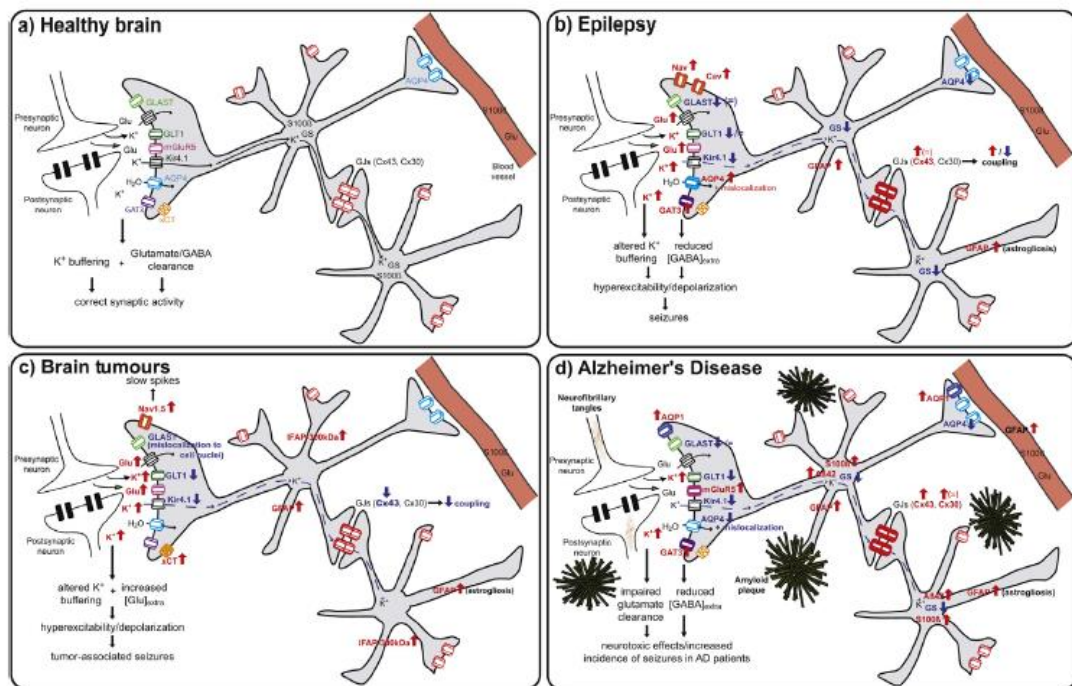


Figura 20 Alterazioni astrogliali nelle patologie del sistema nervoso centrale [Dossi et al., 2018].

1.3 Tecniche di indagine standard per lo studio delle funzionalità astrogliali

Lo studio delle cellule astrogliali risulta complesso perché gli astrociti non generano potenziali d'azione e perché l'espressione di recettori transmembrana comuni ai neuroni e le dimensioni dei pedicelli a contatto con le sinapsi sono tali per cui è difficile raggiungere risoluzioni spaziali e specificità cellulare adeguate [Li et al., 2013]. Allo stato dell'arte, le metodologie disponibili per lo studio delle cellule astrogliali si basano principalmente su tecniche di elettrofisiologia, registrazione extracellulare mediante micro-electrode array e calcium imaging.

1.3.1 Elettrofisiologia

L'applicazione di registrazioni elettrofisiologiche su cellule gliali ha consentito l'identificazione delle correnti ioniche in astrociti, fornendo le basi per la comprensione dell'attività fisiologica astrogliale e dell'interazione neuro-gliale.

La tecnica elettrofisiologica del patch-clamp è stata introdotta nel 1976 da Erwin Neher e Bert Sakmann per la registrazione delle correnti dei singoli canali ionici presenti nella membrana cellulare [Neher e Sakmann, 1976] e costituisce un perfezionamento di quella di voltage clamp.

La tecnica del voltage clamp consente di bloccare il potenziale di membrana mantenendolo fisso a un valore definito. Il potenziale di membrana viene misurato da un amplificatore connesso ad una coppia di elettrodi, uno intracellulare ed uno extracellulare. Mediante un meccanismo a feedback negativo, l'amplificatore confronta il potenziale di membrana con il voltaggio imposto e controlla la differenza fra i due segnali, iniettando o sottraendo corrente, in modo da misurarne gli effetti sulla conduttanza di membrana di singole specie ioniche [Kandel et al., 2015].

La tecnica del patch-clamp (figura 21) consiste nel bloccare la differenza di potenziale elettrico in una piccola area della membrana cellulare o dell'intera cellula. Prevede l'utilizzo di una micropipetta di vetro che contiene un elettrodo metallico immerso in una soluzione elettrolitica per favorire la conduzione degli ioni. Esso connette la micropipetta a un circuito elettrico che misura la corrente che passa attraverso i canali ionici presenti nel tratto di membrana sottostante al microelettrodo.

L'estremità della micropipetta viene fatta aderire alla membrana ed esercitando una suzione si ottiene un sigillo ad alta resistenza con la membrana cellulare, il "giga-seal" (configurazione cell attached). Questa forte aderenza riduce notevolmente il rumore elettronico di fondo della registrazione.

Il patch-clamp in configurazione whole cell (figura 22) prevede l'isolamento di un'area di membrana mediante una lieve aspirazione in modo da fornire all'elettrodo un accesso elettrico a bassa resistenza, consentendo il blocco della tensione

transmembrana e la registrazione della somma delle correnti ioniche. In alternativa, è possibile isolare una porzione di membrana dalla cellula e valutare le correnti attraverso singoli canali tramite la tecnica del patch-clamp in configurazione inside-out o outside-out (figura 22) [Hamill et al., 1981].

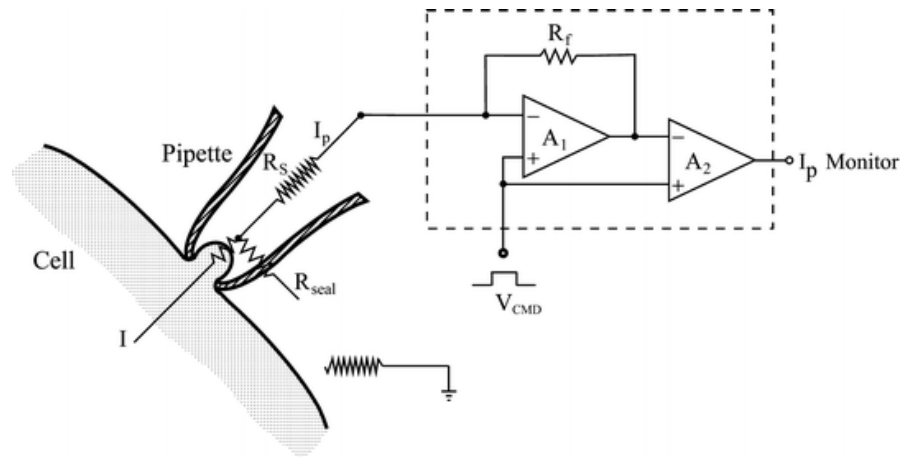


Figura 21 La tecnica del patch-clamp [Akita et al., 2012].

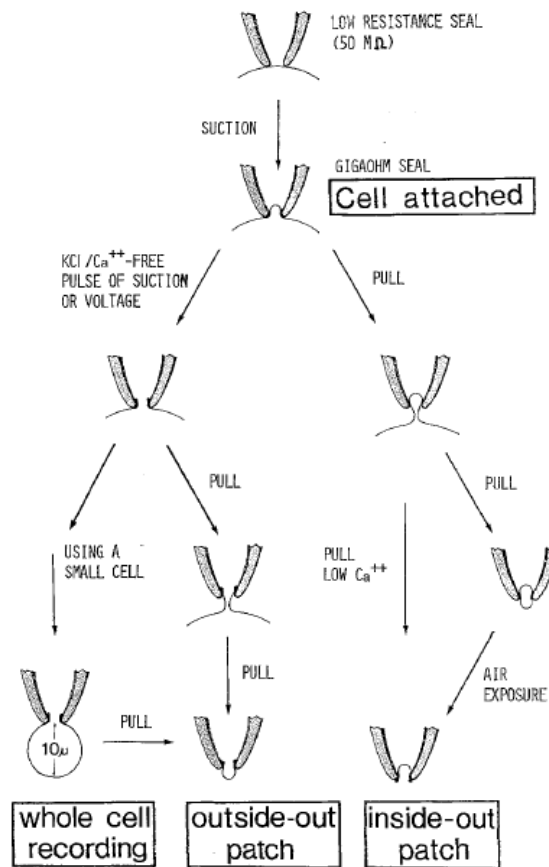


Figura 22 Rappresentazione delle procedure che conducono a differenti configurazioni di registrazione elettrofisiologica [Hamill et al., 1981].

1.3.2 Micro-electrode Arrays

Lo studio delle proprietà di cellule eccitabili *in vitro* si basa tradizionalmente su tecniche elettrofisiologiche standard, che, tuttavia, sono limitate dalla difficoltà di registrare simultaneamente l'attività elettrica di più cellule per un periodo di tempo prolungato. Negli anni '70, i vantaggi delle tecniche di registrazione extracellulare insieme all'avvento dei processi di fabbricazione di materiali a film sottile ha favorito lo sviluppo di substrati integrati con matrici di microelettrodi (MEA) (figura 23). Thomas e colleghi hanno sviluppato il primo MEA nel 1972, un dispositivo con 30 microelettrodi in oro rivestiti con nero di platino (due array di 15 elettrodi ciascuno, distanziati di 100 micron) incorporato in un substrato di vetro, per la registrazione dell'attività di cardiomiociti in coltura [Thomas et al., 1972]. I progressi tecnologici degli anni successivi hanno consentito lo sviluppo di tecnologie MEA per la stimolazione e la rilevazione dei potenziali d'azione in colture di neuroni, risultando uno strumento efficace nell'indagine delle dinamiche di modelli neuronali *in vitro* [Keller & Frega, 2019].

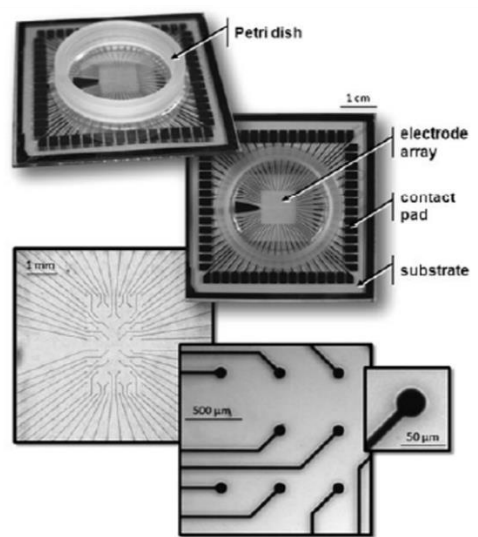


Figura 23 A) Micro-electrode array standard (MEA), costituito da 6X10 elettrodi di diametro 30 μm e distanza interelettrodo di 500 μm [Masi et al., 2012].

La tecnologia MEA (multielectrode arrays o multielectrode array) fornisce l'opportunità di registrare e stimolare l'attività elettrica di gruppi di cellule elettrogeniche, simultaneamente e in modo non invasivo. I potenziali extracellulari

vengono registrati attraverso array di microelettrodi extracellulari planari costruiti sul substrato in contatto con le cellule in coltura [Masi et al., 2012].

Uno degli obiettivi fondamentali della fabbricazione di elettrodi per applicazioni MEA è quello di ottenere una bassa impedenza in modo da garantire un rapporto segnale/rumore adeguato, necessario per permettere la detezione di piccoli segnali extracellulari (da 10 a 100 μV). Gli elettrodi sono generalmente realizzati in oro, platino, o ossido di iridio. Risulta difficile raggiungere una bassa impedenza con elettrodi planari di dimensioni micrometriche. Perciò, la ricerca si è concentrata sull'aumento della superficie effettiva mediante la modifica dell'elettrodo con materiali conduttori porosi, come platino nero, nanostrutture di oro, nanotubi di carbonio e polimeri conduttori. Modificando la superficie, si riduce l'impedenza dell'elettrodo, portando al miglioramento delle registrazioni elettriche [Rocha et al., 2016].

La principale applicazione dei MEA è volta alla detezione dei potenziali d'azione nei neuroni. Per migliorare il rapporto segnale/rumore e la risoluzione spaziale, vengono utilizzati filtri che tagliano eventi a bassa frequenza, la cui rilevazione è compromessa o inibita. Le cellule gliali, così come i gliomi, non presentano potenziali d'azione, ma mostrano oscillazioni del potenziale di membrana.

L'approccio adottato da Rocha e colleghi (figura 24) ha permesso di indagare l'attività elettrica della linea cellulare C6 di glioma di ratto come sistema modello di tumore cerebrale, sfruttando elettrodi con aree di pochi millimetri quadrati, (maggiori rispetto alle aree degli elettrodi presenti nei sistemi MEA convenzionali), per favorire la diminuzione dell'impedenza di elettrodo. Con questo approccio, il livello di rumore può essere ridotto a soli 0,3 mVpp. Tuttavia a causa della grande area dell'elettrodo, i segnali delle singole cellule non possono essere risolti e le informazioni spaziali vengono perse. Pertanto, il layout degli elettrodi è stato ottimizzato per rilevare i segnali provenienti da un'intera popolazione di cellule aderite all'elettrodo.

Il sensore comprende due elettrodi circolari; uno funge da elettrodo di misura e l'altro funge da elettrodo contatore. Il circuito equivalente tiene conto del doppio

strato elettrico stabilito all'interfaccia metallo/elettrolita., sfruttando l'elevata capacità del doppio strato. Le piccole tensioni extracellulari delle cellule aderite all'elettrodo inducono correnti di spostamento attraverso il doppio strato capacitivo che vengono amplificate da un amplificatore a transimpedenza di un fattore di guadagno pari alla capacità a doppio strato. Quindi, la minima attività elettrica della glia e delle cellule di glioma può essere rilevata.

Sfruttando quindi l'ampia area degli elettrodi, che massimizza la capacità del doppio strato elettrico, la sensibilità del sistema aumenta senza compromettere la risoluzione dei segnali bioelettrici [Rocha et al., 2016].

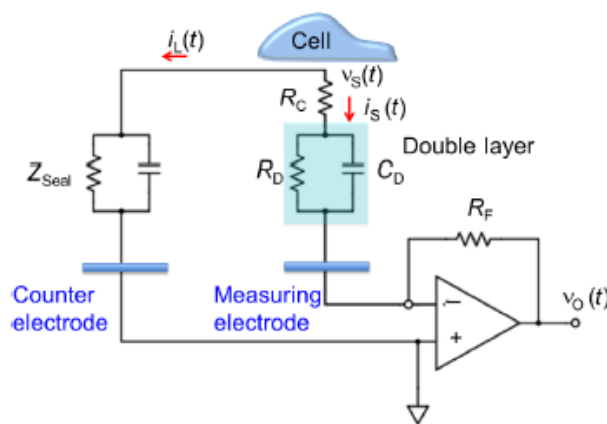


Figura 24 Circuito equivalente dell'accoppiamento cellula-elettrodo per la registrazione extracellulare. R_D , resistenza di trasferimento di carica; C_D , capacità del doppio strato elettrico; R_C , resistenza di spreading; Z_{Seal} , impedenza di sigillo; R_F , resistenza di retroazione. [Rocha et al., 2016].

Questa strategia ha reso possibile la registrazione extracellulare di cellule di glioma, dimostrando che, pur non essendo elettrogeniche, sono coinvolte nell'attività elettrica cerebrale, indipendentemente da stimoli neuronali.

Tuttavia l'accoppiamento cellula-elettrodo e l'impedenza legata alle dimensioni dell'elettrodo rimangono ancora problemi aperti che limitano la sensibilità di rilevamento dei sistemi MEA. Negli ultimi dieci anni, lo sviluppo di MEA ad elevata densità di elettrodi, costruiti sfruttando la tecnologia CMOS, ha permesso un aumento della risoluzione spatio-temporale. Inoltre la possibilità di utilizzare l'approccio MEA in combinazione con altre tecniche come il Calcium imaging ed il patch-clamp, potrebbe risolvere alcuni di questi problemi.

1.3.3. Calcium imaging

La diversità dei segnali di calcio che originano in differenti regioni cellulari suggerisce che non esiste una sola tecnica per misurare tali dinamiche. La tecnica del Calcium imaging rappresenta un comune approccio impiegato per monitorare risposte di calcio in astrociti. Essa si basa sull'utilizzo di indicatori fluorescenti sensibili alle concentrazioni di calcio citosolico, che esibiscono un incremento di fluorescenza in seguito al legame con gli ioni calcio. Il concetto alla base dell'utilizzo di indicatori di calcio è che cambiamenti della loro intensità di fluorescenza riflettono variazioni nella concentrazione di calcio intracellulare [Bootman et al., 2013].

Esiste un'ampia varietà di indicatori di calcio disponibili in commercio, che presentano diverse proprietà spettrali. Gli indicatori fluorescenti del calcio si dividono in raziometrici (dual-wavelength) e single-wavelength. Gli indicatori raziometrici sono i più utilizzati per misure quantitative della concentrazione di calcio, mentre gli indicatori single-wavelength sono più comunemente usati per misure qualitative [Bootman et al., 2013].

La molecola Fluo4-AM è il fluoroforo più utilizzato per monitorare l'attività del calcio in popolazioni di astrociti (figura 26) [Li et al., 2013].

La scelta dell'indicatore di calcio deve essere valutata attentamente in base alle caratteristiche del segnale di calcio da misurare, alla necessità di dati qualitativi o quantitativi, al sistema hardware disponibile e ai potenziali problemi che potrebbero presentarsi. L'intensità di fluorescenza emessa è funzione di differenti fattori: la lunghezza d'onda di eccitazione, la concentrazione e la localizzazione citosolica dell'indicatore. L'alterazione di uno di questi fattori provoca una variazione di fluorescenza indipendentemente dalla presenza di un segnale di calcio. Variazioni della concentrazione dell'indicatore derivano da fenomeni quali: photobleaching, estrusione o compartimentazione dell'indicatore. Il fenomeno del photobleaching del fluoroforo causa un'irreversibile perdita di fluorescenza e costituisce il maggior problema per esperimenti che richiedono una lunga durata o una rapida acquisizione dell'immagine. Il motivo principale del photobleaching è dovuto alla reazione che

si instaura tra l'indicatore e l'ossigeno durante lo stato eccitato, che comporta la formazione di una molecola non fluorescente. Una continua perdita di fluorescenza può compromettere l'acquisizione del segnale di calcio. Inoltre la selezione di indicatori che possano essere eccitati da radiazioni nello spettro del visibile (luce verde o rossa) rispetto all'utilizzo di raggi UV, può ridurre il danno cellulare provocato dall'irradiazione [Bootman et al., 2013].

Un tipico setup di base per il calcio imaging in fluorescenza comprende un microscopio (solitamente invertito), una sorgente luminosa, specchi e filtri adeguati per separare le radiazioni di eccitazione e di emissione, un obiettivo adatto e un detector (figura 25).

Esistono diversi approcci sperimentali per monitorare le dinamiche del calcio mediante indicatori fluorescenti, basati su modalità di imaging che variano dalla microscopia wide-field alla microscopia confocale, fino alla microscopia a due fotoni [Sanderson et al., 2014].

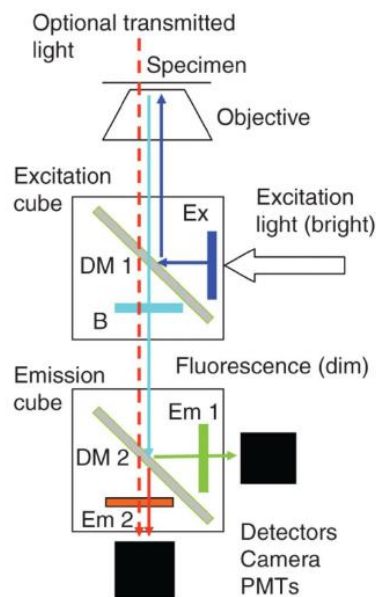


Figura 25 Il percorso della luce nel microscopio a fluorescenza. Un filtro di eccitazione (Ex) accoppiato con uno specchio dicroico (DM 1) dirige la luce di eccitazione (proveniente da una lampadina o un laser) al campione e la fluorescenza emessa viene trasmessa al filtro di emissione per un'ulteriore separazione. Il filtro barriera B impedisce alla luce di eccitazione di raggiungere i rivelatori. La fluorescenza emessa è separata dallo specchio dicroico DM 2 in due raggi. I filtri di emissione (Em 1 ed Em 2) bloccano la luce indesiderata. La fluorescenza viene rilevata da telecamere o tubi fotomoltiplicatori (PMT) [Sanderson et al., 2014].

Sebbene i concetti di fluorescenza e di separazione ottica rimangano simili, il design del microscopio varia con l'obiettivo di aumentare il contrasto dell'immagine e la risoluzione spaziale. Alcuni comuni aspetti chiave da gestire nella configurazione di un esperimento riguardano la scelta dell'obiettivo e il setting dei parametri di imaging (gain, offset, bit depth) per garantire l'acquisizione ottimale dell'immagine. L'imaging dei segnali di calcio cellulari richiede generalmente un trade-off tra fattori come la risoluzione dell'immagine, la velocità di acquisizione dell'immagine e l'intensità di eccitazione.

Il metodo di analisi dei dati dipende dal tipo di segnali raccolti (per esempio segnali single-wavelength piuttosto che double-wavelength) e dall'output richiesto (per esempio la rappresentazione dell'intensità di fluorescenza da regioni di interesse). Tipicamente si rappresentano i dati rilevanti previa la rimozione dei segnali di background e la normalizzazione o calibrazione della fluorescenza.

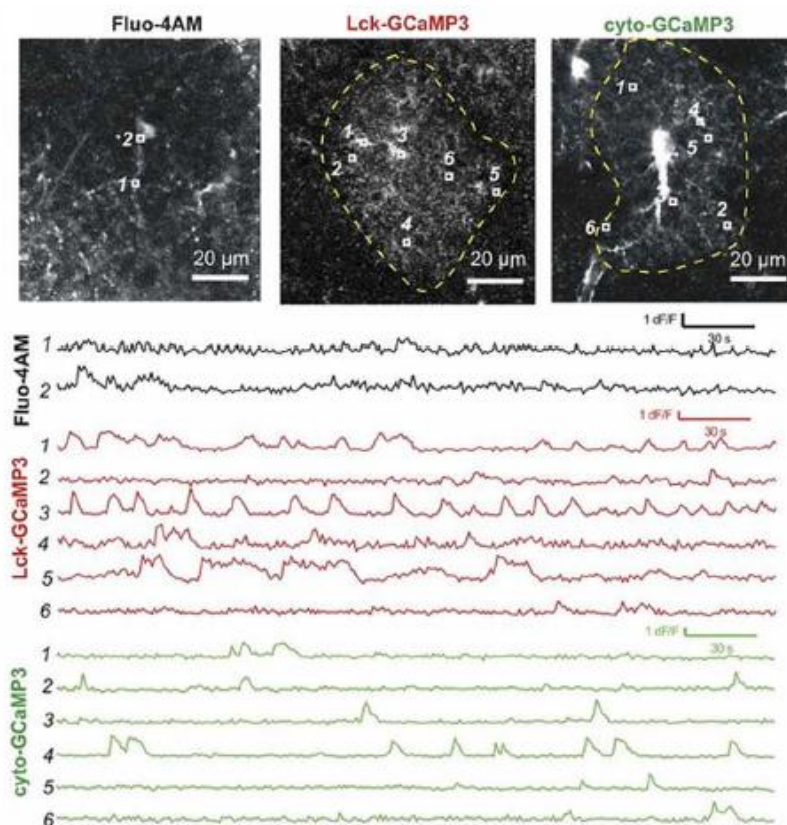


Figura 26 Segnali di calcio in astrociti, caricati con Fluo-4, cyto-GCaMP3 e Lck-GCaMP3 [Li et al., 2013].

Il metodo del calcium imaging mediante indicatori fluorescenti fornisce un approccio efficiente per lo studio dei segnali di calcio, con buona risoluzione spazio-temporale. La disponibilità di indicatori fluorescenti sensibili al calcio fornisce uno strumento per esplorare segnali di calcio spazialmente e temporalmente diversi in astrociti, permettendo l'imaging di regioni somatiche e dei processi prossimali più grandi, ma non consentendo di osservare correttamente i cambiamenti di calcio nei microdomini. Inoltre, talvolta la mancanza di specificità di questi indicatori permeabili alla membrana rende necessario l'uso di marcatori secondari per consentire la differenziazione di neuroni e astrociti. Indicatori di calcio codificati geneticamente (GECI) rappresentano un'alternativa per l'imaging non invasivo dell'attività del calcio *in vivo*.

Al contempo, approcci di imaging combinati con tecniche di microscopia a super risoluzione, come la microscopia STED (Stimulated Emission Depletion), possono aggirare i limiti di diffrazione della tradizionale microscopia ottica, offrendo vantaggi in termini di risoluzione spaziale e permettendo di visualizzare anche immagini di dendriti *in vivo* [Sanderson et al., 2014].

1.4 Interfacce neurali

L'applicazione di interfacce neurali elettricamente funzionali sta diventando uno strumento efficace per lo sviluppo di soluzioni cliniche che richiedono la stimolazione e/o la registrazione dell'attività elettrica del sistema nervoso [Kostarelos et al., 2017]. La possibilità di acquisire e modulare elettricamente l'attività cerebrale mediante interfacce neurali è alla base di strategie terapeutiche attualmente disponibili o emergenti volte al trattamento di differenti condizioni neuropatologiche e disabilità sensoriali e motorie.

La funzionalità dell'interfaccia neurale consiste nel registrare l'attività neuronale e ripristinare il segnale compromesso mediante la stimolazione elettrica di differenti strutture neuronali (figura 27) [Hatsopoulos et al., 2009]. Essa opera iniettando corrente in corrispondenza del tessuto nervoso intatto mediante array di elettrodi, per rigenerare l'attività elettrica mancante [Yue et al., 2016]. I dispositivi

impiantabili attivi rappresentano un approccio promettente per la cura di varie disfunzioni che colpiscono il sistema nervoso centrale e periferico [Hatsopoulos et al., 2009, Kostarelos et al., 2017].

La Deep Brain Stimulation (DBS), basata sulla stimolazione elettrica di strutture profonde del cervello, è utilizzata in clinica per il trattamento di disfunzioni neuromotorie, come malattia di Parkinson, distonia e tremore muscolare. La DBS è in fase di sviluppo clinico per altri disturbi neurologici resistenti ai farmaci, come la depressione ed il disturbo ossessivo-compulsivo [Perlmutter et al., 2006].

Gli impianti cocleari, ampiamente usati in clinica, sono in grado di rigenerare il segnale mancante nella coclea mediante la trasduzione di onde sonore esterne in impulsi elettrici che vengono inviati ad un array di elettrodi in corrispondenza della coclea [Spelman et al., 2006]. Concettualmente simili agli impianti cocleari, le protesi retiniche sono destinate a ripristinare parzialmente la vista in pazienti non vedenti che soffrono di patologie della retina associate alla perdita dei fotorecettori [Yue et al., 2016, Picaud et al., 2014]. La stimolazione elettrica del sistema nervoso centrale e periferico può essere applicata anche mediante dispositivi neuroprotesici a livello del midollo spinale o di nervi e muscoli periferici per ripristinare la funzione sensoriale e motoria. Sono in corso di sviluppo dispositivi per il controllo di arti robotici ed impianti corticali volti al recupero della funzionalità motoria in condizioni di lesione del midollo spinale e sclerosi laterale amiotrofica [Kostarelos et al., 2017].

Ciascuno di questi dispositivi impiantabili ha raggiunto diverse fasi di sviluppo clinico, ma tutti sono basati sullo stesso concetto di interazione diretta con differenti strutture neurali: creare una connessione fra il sistema nervoso e l'ambiente esterno, andando a registrare e/o stimolare l'attività del tessuto neuronale mediante array di elettrodi e collegandosi ad un'unità esterna di elaborazione dell'informazione e ad una fonte di alimentazione [Hatsopoulos et al., 2009, Kostarelos et al., 2017].

Nel contesto della ricerca neuroscientifica di base, la registrazione elettrofisiologica dell'attività cerebrale risulta fondamentale per la comprensione dei potenziali d'azione prodotti dai singoli neuroni e dei fenomeni di comunicazione intercellulare

alla base delle reti neurali. È possibile eseguire registrazioni elettrofisiologiche dell'attività cerebrale posizionando le matrici di elettrodi in diverse aree, ad esempio esternamente sullo scalpo, sopra o sotto la dura madre e all'interno della corteccia. [Kostarelos et al., 2017].

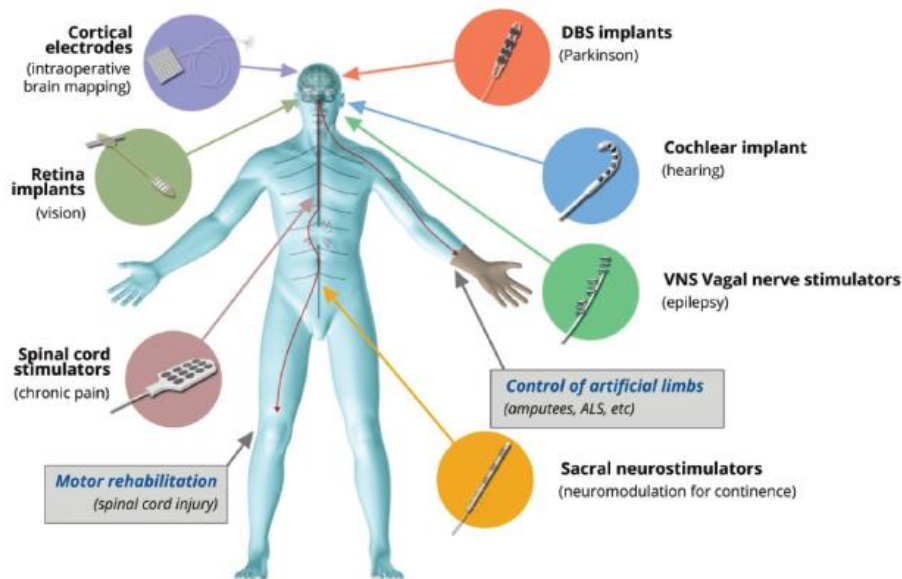


Figura 27 Dispositivi impiantabili utilizzati come interfacce neurali per applicazioni cliniche [Kostarelos et al., 2017].

A causa della complessità del sistema nervoso e dei siti anatomici d'impianto, il successo di nuove tecnologie biomediche richiede l'uso di materiali avanzati e dispositivi elettronici flessibili. Qualsiasi interfaccia neurale progettata per l'impianto dovrebbe essere il meno invasiva possibile, consentire una facile procedura chirurgica e garantire un'attività efficiente per la durata della sua vita funzionale. Alcuni requisiti chiave per raggiungere questo obiettivo sono i seguenti:

- i) adeguato rapporto segnale-rumore della registrazione neurale. Le capacità di registrazione dovrebbero consentire il rilevamento di segnali di singoli neuroni (fino a poche decine di μV) e di gruppi di neuroni (inducendo local field potentials di poche centinaia di μV); la registrazione dovrebbe essere possibile su aree estese (poche decine di cm^2) e con alta risoluzione spaziale (centinaia di μm^2 del sito di registrazione attivo).

ii) adeguate capacità di iniezione di carica per applicazioni di stimolazione. La stimolazione elettrica richiede un livello minimo di iniezione di carica al fine di suscitare una risposta nel tessuto nervoso stimolato. In genere, i livelli minimi di carica richiesti variano da centinaia di $\mu\text{C cm}^{-2}$ a pochi mC cm^{-2} , con impulsi compresi tra 100 μs e 1 ms. Una tale capacità di carica dovrebbe consentire la stimolazione focale mediante elettrodi con aree attive fino a centinaia di μm^2 .

iii) conformità meccanica e biocompatibilità. Per ridurre al minimo la reazione infiammatoria all'impianto, l'interfaccia neurale dovrebbe esibire una buona biocompatibilità e conformità meccanica rispetto al tessuto neurale che circonda il dispositivo. La stabilità a lungo termine dei dispositivi impiantati può essere significativamente migliorata riducendo lo stress meccanico tra i tessuti nervosi e i dispositivi impiantabili.

L'insuccesso di tecnologie biomediche è spesso associato a insoddisfacenti proprietà intrinseche dei materiali impiegati, che limitano l'affidabilità e la stabilità degli impianti. Per esempio, metalli e silicio sono fra i materiali più utilizzati per la fabbricazione di dispositivi impiantabili convenzionali. Tuttavia la ridotta stabilità nel lungo termine in ambiente fisiologico, la rigidità meccanica e l'elevato potenziale infiammatorio restano problemi irrisolti (Reina et al., 2017).

Nell'ultimo decennio nuovi materiali sono stati integrati in dispositivi combinando elevata capacità a doppio strato, biocompatibilità e flessibilità. Tuttavia problemi di instabilità chimica e meccanica ne rendono difficile l'applicazione clinica. Ad esempio, l'ossido di iridio è soggetto a corrosione, substrati basati su nanotubi di carbonio possono andare incontro al distacco dell'elettrodo, substrati di PEDOT possono degradarsi nel tempo in soluzioni acquose. Nonostante i recenti progressi, le attuali interfacce neurali non soddisfano ancora tutte le sfide sopra discusse, a causa di problemi di stabilità e delle limitazioni tecnologiche legate ai materiali impiegati [Kostarelos et al., 2017]. Inoltre tali tecnologie si rivolgono principalmente all'interazione con i neuroni.

1.4.1 Interfacce Neurali e astrociti

I dispositivi destinati alla terapia di neuropatologie interagiscono non solo con le cellule neuronali ma anche con le cellule gliali. L'astrogliosi reattiva è la tipica reazione *in vivo* all'inserimento di un impianto neuroprotesico, accompagnata dalla formazione di una cicatrice gliale che circonda ed incapsula il dispositivo, con uno spessore di centinaia di micrometri. La crescita di tessuto fibroso attorno all'impianto compromette la funzionalità del dispositivo (figura 28), ostacolando la rigenerazione neuronale ed innescando processi dannosi che possono condurre alla morte del tessuto nervoso. L'astrogliosi deve essere il più possibile limitata mediante dispositivi biocompatibili: la sintesi di materiali in grado di favorire l'adesione e la crescita di astrociti, minimizzandone il potenziale infiammatorio, costituiscono una necessità in neuroingegneria e medicina neurorigenerativa [Salatino et al., 2017].

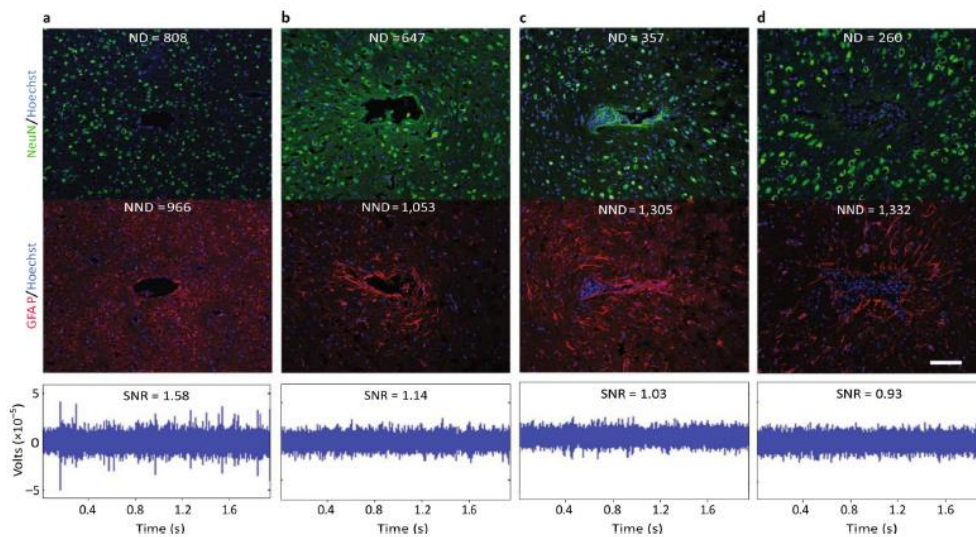


Figura 28 Impatto della gliosi sulla qualità della registrazione. ND, densità neuronale media; NND, densità non neuronale media. Scala, 100 μm [Salatino et al., 2017].

Pertanto lo studio dell'interazione tra astrociti e biomateriali è essenziale per la fabbricazione e la validazione di dispositivi biofunzionali, che si interfaccino al sistema nervoso.

Lo sviluppo di biomateriali per la rigenerazione del sistema nervoso centrale rappresenta un'attiva area di indagine in medicina neurorigenerativa. I biomateriali possono rilasciare terapie nel sito della lesione per mitigare l'infiammazione, fornire

neuroprotezione e indurre la rigenerazione assonale. Quest'area della ricerca si è concentrata in larga misura sulla rigenerazione assonale dei neuroni, ma raramente viene esaminato il ruolo degli astrociti all'interfaccia con il materiale, nel sito danneggiato. La cicatrice astrogliale forma una barriera fisica che limita l'estensione della rigenerazione assonale. Tuttavia diversi effetti benefici della cicatrice gliale includono la ricostruzione della barriera ematoencefalica, la capacità di limitare l'estensione di lesioni secondarie ed il sostegno alla crescita degli assoni in prossimità della lesione.

In risposta a differenti biomateriali, gli astrociti vanno incontro a differenti cambiamenti fenotipici, indirizzandosi verso il fenotipo più favorevole in grado di promuovere la sopravvivenza neuronale e la rigenerazione assonale.

Idrogels, scaffold polimerici, substrati e superfici patternati e altri biomateriali innovativi sono stati sviluppati per indurre la rigenerazione neuronale. Al fine di progettare biomateriali che favoriscano l'interazione con gli astrociti, esperimenti *in vitro* sono stati effettuati per comprendere la risposta astrogliale alla presenza di diversi biomateriali e superfici, in termini di adesione, cambiamenti morfologici, proliferazione, migrazione, espressione genica ed espressione proteica.

Su superfici bidimensionali lisce gli astrociti dimostrano tipicamente una morfologia piatta.

Le cellule astrogliali rilevano la micro e nanotopografia della superficie e possono innescare processi di astrogliosi reattiva in risposta a cambiamenti esterni. Studi sull'interazione tra topografia di superficie e la risposta astrocitaria hanno mostrato che cellule astrogliali cresciute su microtopografie isotrope mostrano morfologie stellate, mentre su micropattern e microstrutture anisotrope mostrano forme sia bipolari che stellate che si allineano lungo la direzione della superficie. Micro e nanostrutture allineate hanno dimostrato di orientare la crescita degli astrociti parallelamente all'allineamento della superficie. L'analisi dei profili di espressione proteica e genica ha rivelato che astrociti corticali primari cresciuti su nanofibre di policaprolattone (PCL) mostrano, rispetto alla condizione di controllo, una riduzione dell'espressione di GFAP e sovraespressione di geni coinvolti nella

motilità cellulare, promozione della sopravvivenza neuronale e trasporto di glutammato. Inoltre astrociti coltivati su fibre di acido poli-L-lattico hanno evidenziato un aumento dell'espressione immunoistochimica e proteica di trasportatori del glutammato (EAAT2). Questo suggerisce che gli astrociti non sono solo meno reattivi quando sono in contatto con fibre polimeriche, ma possono anche favorire la crescita dei neuroni [Zuidema et al., 2018].

1.4.2 Astrociti e materiali semiconduttori organici

La possibilità di modulare l'attività cellulare mediante l'utilizzo di materiali semiconduttori organici risiede principalmente nelle proprietà intrinseche di questi materiali. In particolare, i materiali semiconduttori organici, sia come piccole molecole che polimeri, intrinsecamente sensibili alla luce nello spettro del visibile, sono biocompatibili per maggiore similitudine chimica con le macromolecole biologiche, e la loro flessibilità meccanica consente un'interfaccia intima che induce meno reattività infiammatoria nel tessuto biologico sia *in vitro* [Ghezzi et al., 2013, Benfenati et al., 2014] che *in vivo* [Vetencourt et al., 2017].

In quest'ottica sfruttando le proprietà optoelettroniche di polimeri organici coniugati sono stati proposti nuovi approcci di fotostimolazione basati sull'uso di polimeri coniugati (CP) fotosensibili in grado di trasdurre efficacemente uno stimolo ottico in una modulazione dell'attività elettrica delle cellule.

La fotostimolazione di una miscela polimerica fotovoltaica organica (P3HT:PCBM) (figura 29) ha dimostrato di promuovere la generazione di potenziali d'azione in neuroni ippocampali coltivati sul substrato. Nell'eterogiunzione bulk, il P3HT (poli 3-esiltiofene) funziona come materiale donatore di elettroni e il PCBM (estere metilico dell'acido fenil-C61-butirrico (PCBM) si comporta da accettore di elettroni, garantendo così un'efficienza quantica molto elevata nel processo di generazione della carica. Lo strato polimerico attivo è stato depositato mediante la tecnica dello spin-coating su di un substrato vetroso, pre-ricoperto da ossido di indio stagno (ITO), che agisce da anodo. La biocompatibilità del dispositivo ITO/P3HT:PCBM in neuroni ippocampali è stata indagata mediante saggi di vitalità. Non sono

state riscontrate differenze significative nella vitalità o mortalità cellulare rispetto al controllo [Ghezzi et al., 2011].

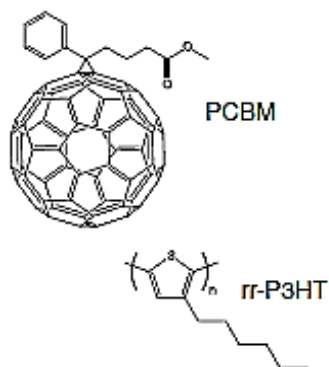


Figura 29 Struttura chimica del PCBM e del rr-P3HT [Ghezzi et al., 2011].

Inoltre i risultati hanno dimostrato che un film polimerico di P3HT può agire come uno strato di fotorecettori artificiali e ripristinare la fotosensibilità in retine affette da degenerazione fotorecettoriale, suggerendo la possibilità di impiego nel campo delle protesi retiniche

La progettazione di una protesi completamente organica per l'impianto subretinale nel ratto è stata condotta dal gruppo di Antognazza e colleghi [Antognazza et al., 2016, Vetencourt et al., 2017]. L'elettrofisiologia e le analisi comportamentali rivelano un recupero della sensibilità alla luce e dell'acuità visiva che persiste fino a 6-10 mesi dopo l'intervento chirurgico.

I risultati riportati convalidano l'impiego di semiconduttori organici in dispositivi biofunzionali impiantabili. Tuttavia, sono necessari studi sulle cellule gliali e specialmente sugli astrociti per comprendere pienamente l'impatto di questi materiali nelle protesi neurali.

Lo studio di Benfenati e collaboratori spiega per la prima volta il meccanismo di fototrasduzione in astrociti all'interfaccia con polimeri organici (figura 30), dimostrando che la miscela fotovoltaica P3HT: PCBM, la stessa utilizzata per le colture neuronali, supporta la crescita di astrociti neocorticali di ratto in coltura primaria [Benfenati et al., 2014]. Per studiare l'effetto della fotostimolazione della miscela sul potenziale della membrana degli astrociti, sono stati condotti esperimenti di patch-clamp, dai quali risulta che la fotoeccitazione del materiale

provoca una depolarizzazione significativa del potenziale di membrana a riposo astrogliale: l'effetto è associato ad un aumento della conduttanza a potenziali negativi, mediato in particolare da canali del cloro (ClC-2), e l'entità della densità di corrente interna evocata è proporzionale all'intensità di eccitazione.

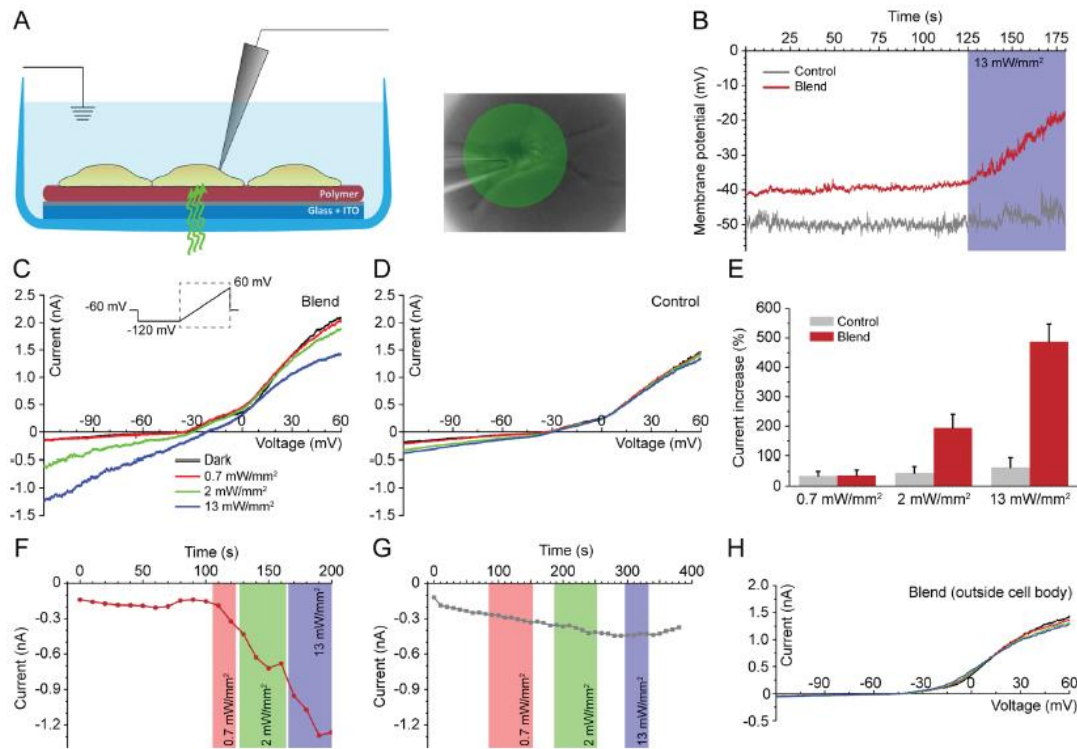


Figura 30 Modulazione della conduttanza di membrana astrogliale mediata dalla fotostimolazione di polimeri organici [Benfenati et al., 2014].

I transistor organici ad effetto di campo (OFET) offrono vantaggi significativi rispetto ai tradizionali FET a base di silicio, come migliore biocompatibilità a lungo termine, flessibilità meccanica e fabbricazione a basso costo.

Approcci di stimolazione e registrazione bidirezionale sono stati applicati in neuroni primari del ganglio della radice dorsale (DRG) mediante FET trasparenti basati su P13 (diimide N, N'-ditridecilperilene-3,4,9,10-tetracarbossilico). Il dispositivo O-CST (Organic Cell Stimulating and Sensing Transistor) si è dimostrato compatibile con la crescita, la differenziazione e la funzionalità dei neuroni DRG, e consente la depolarizzazione e l'iperpolarizzazione del potenziale di membrana neuronale. La trasparenza del dispositivo permette anche l'imaging ottico della modulazione

dell'attività bioelettrica dei neuroni. Il rapporto segnale/rumore della registrazione extracellulare raggiunto dal dispositivo O CST supera significativamente quello di un sistema MEA sulla stessa preparazione neuronale [Benfenati et al., 2013].

Un recente lavoro [Borrachero-Conejo et al., 2019] riporta per la prima volta l'effetto del campo elettrico prodotto da un dispositivo a semiconduttore organico sull'attività astrogliale (figura 31). Presenta l'utilizzo dello stesso dispositivo O-CST precedentemente applicato in neuroni per monitorare la concentrazione intracellulare di calcio in astrociti neocorticali primari di ratto. Mostrando la capacità dell'O-CST di evocare segnali di calcio negli astrociti, ha fornito una prova sostanziale della potenzialità della bioelettronica organica nel modulare la funzionalità astrogliale.

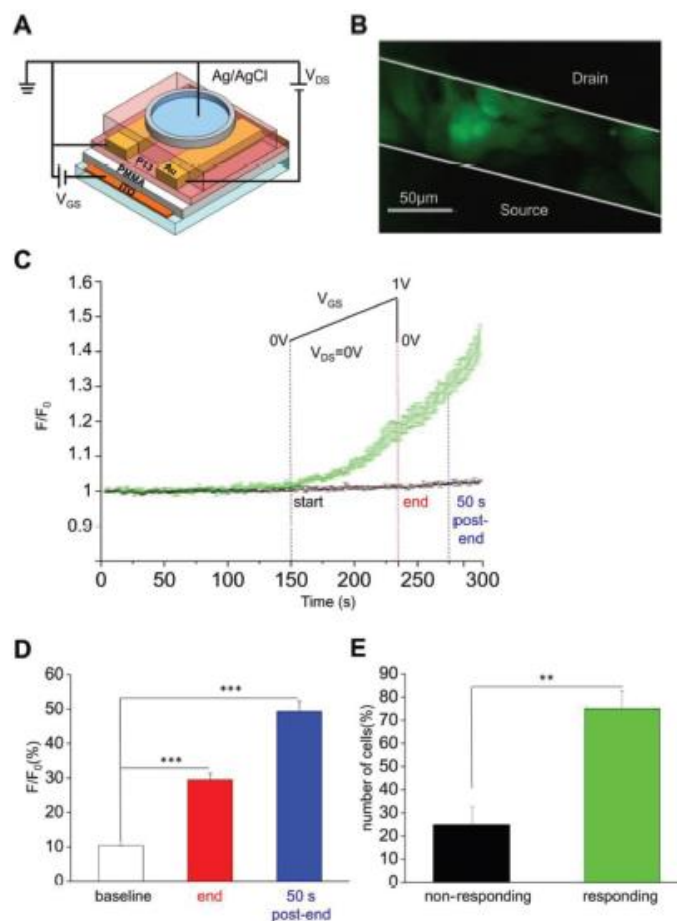


Figura 31 La stimolazione elettrica mediante O-CST promuove incrementi di calcio intracellulare in astrociti [Borrachero-Conejo et al., 2019].

1.4.3 Grafene

Il grafene ha generato un crescente interesse scientifico e tecnologico in molte aree della ricerca, fra cui l'elettronica, la fotonica, la sensoristica, i settori energetico e biotecnologico. In particolare, grazie alle proprietà meccaniche, elettriche ed ottiche uniche, il grafene ed i suoi derivati hanno suscitato grande attenzione in ambito biomedico [Yang et al., 2013].

Il grafene è un nanomateriale bidimensionale costituito da uno strato monoatomico di atomi di carbonio ibridati nella forma sp^2 e disposti a formare un reticolo di celle esagonali [Bianco et al., 2013] dalla caratteristica struttura a nido d'ape. Il grafene è il blocco di costruzione alla base di altre nanostrutture allotropiche del carbonio, che includono i fullereni, i nanotubi di carbonio e la grafite. Impilando più fogli di grafene che interagiscono l'uno con l'altro mediante forze di Van der Waals, si originano nanostrutture di tipo tridimensionale (grafite), monodimensionale (nanotubi di carbonio) e zerodimensionale (fullerene) (figura 32) [Yang et al., 2013].

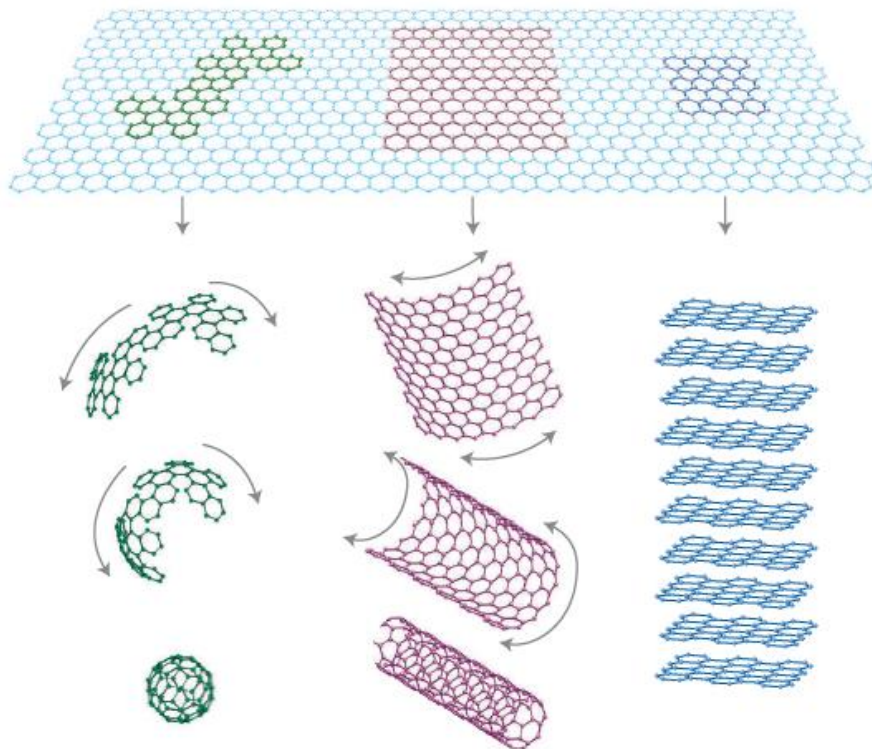


Figura 32 Forme allotropiche del carbonio: fullerene, nanotubi di carbonio, grafene [Geim & Novoselov, 2007].

La scoperta del grafene è attribuita ai fisici dell'Università di Manchester, A. Geim e K. Novoselov, che, nel 2004, isolarono un singolo strato di grafene dalla grafite mediante esfoliazione meccanica, vincendo il Premio Nobel in fisica nel 2010 per la realizzazione del primo transistor a base di grafene [Novoselov et al., 2004]. Da allora, i ricercatori hanno mostrato grande interesse nell'esplorare proprietà ed applicazioni del grafene, che è stato definito "materiale delle meraviglie" [Geim, 2009], principalmente per merito delle sue eccezionali caratteristiche di conduttività elettrica e resistenza meccanica.

Il grafene e i suoi derivati

I nanomateriali appartenenti alla famiglia del grafene sono classificati in base al numero di strati o alla modifica chimica della superficie.

Alcuni dei nanomateriali basati sul grafene ampiamente utilizzati includono il grafene a uno o pochi strati, l'ossido di grafene (Rapporto C/O 1:1), l'ossido di grafene ridotto, nano- e micro-fogli di grafite (più di 10 strati, ma <100 nm di spessore e dimensione laterale media nell'ordine di nm e μm , rispettivamente). Ogni membro differisce dagli altri in termini di numero di strati, funzionalizzazione chimica delle superfici, purezza, dimensioni laterali, densità dei difetti e composizione [Goenka et al., 2014].

Il termine grafene si riferisce ad un singolo strato di grafite, più generalmente a due o pochi strati di grafite, in numero minore di 10 [Geim et al., 2007]. Una varietà di forme ottenute dall'ossidazione della grafite comprende, in particolare, l'ossido di grafene (GO) e l'ossido di grafene ridotto (rGO) (figura 33), derivati del grafene caratterizzati da differenti struttura e proprietà fisico-chimiche, che pertanto, all'interfaccia con sistemi viventi, possono indurre differenti risposte biologiche [Reina et al., 2017].

L'ossido di grafene è un foglio atomico di grafene arricchito da diversi gruppi funzionali ossigenati (acido carbossilico, gruppi epossidici e idrossilici) sui suoi piani basali e ai suoi bordi, risultante in una struttura ibrida costituita da una miscela di atomi di carbonio ibridati sp^2 e sp^3 . Il GO viene sintetizzato a partire

dall'ossidazione della grafite cristallina in ossido di grafite, seguita dall'esfoliazione di tale ossido grafiteico in GO. [Krishnamoorthy et al., 2013]. La presenza di gruppi funzionali ossigenati rende il GO fortemente idrofilo e quindi facilmente disperdibile in acqua, ma crea un'alta densità di difetti che riduce le sue proprietà elettriche, meccaniche e termiche. È infatti un cattivo conduttore ma, mediante processi di riduzione, è possibile ripristinare la maggior parte delle caratteristiche della grafite di partenza, ottenendo l'ossido di grafene ridotto. L'rGO è prodotto principalmente per ristabilire la conduttività elettrica e l'assorbanza ottica nel GO, riducendone il contenuto di ossigeno e l'idrofilicità. Il grafene funzionalizzato è la forma modificata di qualsiasi membro della famiglia del grafene mediante polimeri, molecole di piccole dimensioni, nanoparticelle ecc. al fine di migliorare o alterare le proprietà richieste per un'applicazione specifica [Bramini et al., 2019].

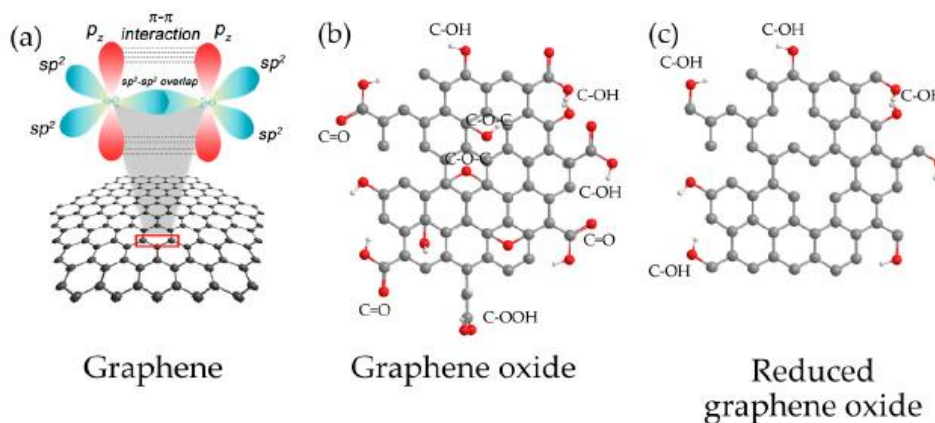


Figura 33 Grafene, ossido di grafene e ossido di grafene ridotto [Suvarnapaet & Pechprasarn, 2017].

Metodi di sintesi

In base alla specifica applicazione e alle proprietà richieste, i metodi di sintesi del grafene e dei suoi derivati si suddividono in due categorie: top-down e bottom-up (figura 34).

L'approccio top-down si basa sull'esfoliazione di un foglio di grafene a partire dalla grafite. L'approccio bottom-up consiste invece nella costruzione del grafene utilizzando materiali a base di carbonio. La tecnica bottom-up è semplice, ma produce materiali con un numero relativamente maggiore di difetti. La tecnica top-

down separa i fogli grafitei rompendo le forze di Van der Waals che mantengono gli strati impilati, mediante processi fisico-chimici. Il possibile danneggiamento dei fogli durante il processo di esfoliazione, la tendenza a riaggregarsi e la scarsità del precursore grafiteo rappresentano alcuni svantaggi dell'approccio top-down. D'altra parte, l'approccio bottom-up richiede temperature molto elevate [Gurunathan & Kim, 2016].

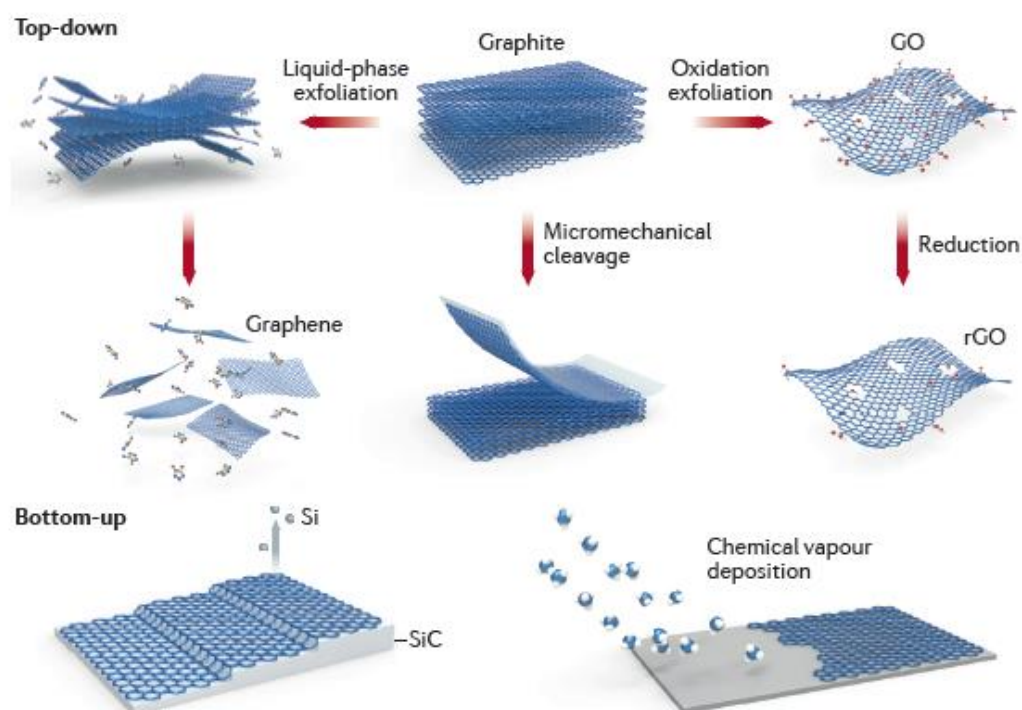


Figura 34 Metodi di sintesi del grafene [Wang et al., 2017].

L'esfoliazione meccanica o "Scotch tape" è stata la prima tecnica top-down ad essere sviluppata per ottenere il grafene dalla grafite. Essa prevede la separazione degli strati di grafite pirolitica mediante un nastro adesivo, che viene premuto sul materiale grafiteo e poi strappato, ottenendo il distacco di un foglio. Ripetendo l'operazione si ricavano fogli via via più sottili, che verranno trasferiti su un substrato apposito (silicio o ossido di silicio) (Lee et al., 2019). Tale tecnica produce fogli di alta qualità e richiede tempi ed intensità di lavoro non compatibili con produzioni su larga scala [Gurunathan & Kim, 2016, Suvarnaphaet & Pechprasarn, 2017].

L'esfoliazione liquida è un'altra tecnica di sintesi top-down per fabbricare grafene in soluzione. La grafite viene mescolata ad un solvente tipicamente organico o ad una dispersione di acqua e surfattante. Si utilizzano gli ultrasuoni per sottoporre a cavitazione la miscela e favorire la dispersione delle molecole di solvente fra i piani della grafite. In seguito gli strati di grafite verranno separati per centrifugazione [Lee et al., 2019, Reina et al., 2017, Suvarnaphaet & Pechprasarn, 2017].

Il metodo di Hummer è uno degli approcci top-down più utilizzati per produrre il GO mediante l'ossidazione chimica della grafite. Esso si basa sull'ossidazione dei cristalli di grafite con una miscela di reagenti (acido solforico, nitrato di sodio e permanganato di potassio). Tramite ultrasonificazione e successiva esfoliazione della grafite ossidata, si ottiene il GO, derivato idrofilico del grafene, in cui il numero di atomi di carbonio decade del 40-60% a favore dell'elevata presenza di ossigeno. Attraverso metodi di riduzione chimici, termici o elettrochimici, il GO può essere posteriormente ridotto, producendo un composto idrofobo, intermedio fra il grafene puro e l'ossido di grafene [Reina et al., 2017, Suvarnaphaet & Pechprasarn, 2017].

La deposizione chimica da vapore (Chemical deposition vapor, CVD) è al momento la tecnica di sintesi bottom-up maggiormente impiegata per la produzione di grafene di buona qualità su scala industriale, volta soprattutto alla fabbricazione di dispositivi bioelettronici. Consiste nell'inserimento all'interno di una camera ad alta temperatura di reagenti gassosi (come metano, etano o propano), i quali diffonderanno al suo interno e andranno a reagire sulla superficie del substrato (in rame o nichel), rilasciando prodotti volatili e atomi di carbonio che si depositano sulla superficie del substrato, inducendo la formazione di un film di grafene. La crescita epitassiale è un ulteriore metodo bottom-up che prevede la crescita epitassiale del grafene su cristalli di SiC. Il substrato viene riscaldato a temperature elevate (1250-1450 °C), in condizioni di vuoto ultra alto. Il silicio va incontro a sublimazione, lasciando sulla superficie gli atomi di carbonio che si aggregano in forma grafenica [Reina et al., 2017, Wang et al., 2017, Suvarnaphaet & Pechprasarn, 2017].

1.4.3.1 Il grafene come interfaccia Neurale

Attualmente le applicazioni biomediche del grafene rappresentano un campo in continua espansione, per via delle notevoli potenzialità d'impiego e le vantaggiose caratteristiche elettriche, ottiche e meccaniche di questo materiale (figura 35).

Le proprietà del grafene includono l'ampia area superficiale ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$) [Stoller et al., 2008], la forte resistenza meccanica (modulo di Young $\sim 1100 \text{ GPa}$, tensione di rottura $\sim 125 \text{ GPa}$) [Lee et al., 2008], l'elevata conduttività termica ($5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) [Balandin et al., 2008]. Inoltre la sua struttura facilita la funzionalizzazione della superficie [Georgakilas et al., 2012]. Il sistema di doppi legami coniugati sopra e sotto il piano, permette un'elevata mobilità elettronica, conferendo al grafene un'eccellente conduttività elettrica (1738 siemens/m) [Weiss et al., 2012]. Il grafene è noto per essere un materiale estremamente sottile: un singolo foglio di grafene ha uno spessore di $\sim 0.34 \text{ nm}$ [Geim, 2009]. La forza dei legami covalenti all'interno degli strati è alla base della sua durezza, mentre i legami deboli fra gli strati consentono il facile scorrimento dei piani [Qu et al., 2018]. Inoltre il grafene è caratterizzato da un'elevata trasparenza e assorbe il 2,3% della radiazione incidente, con una trasmittanza ottica del 97.7% [Kang et al., 2016].

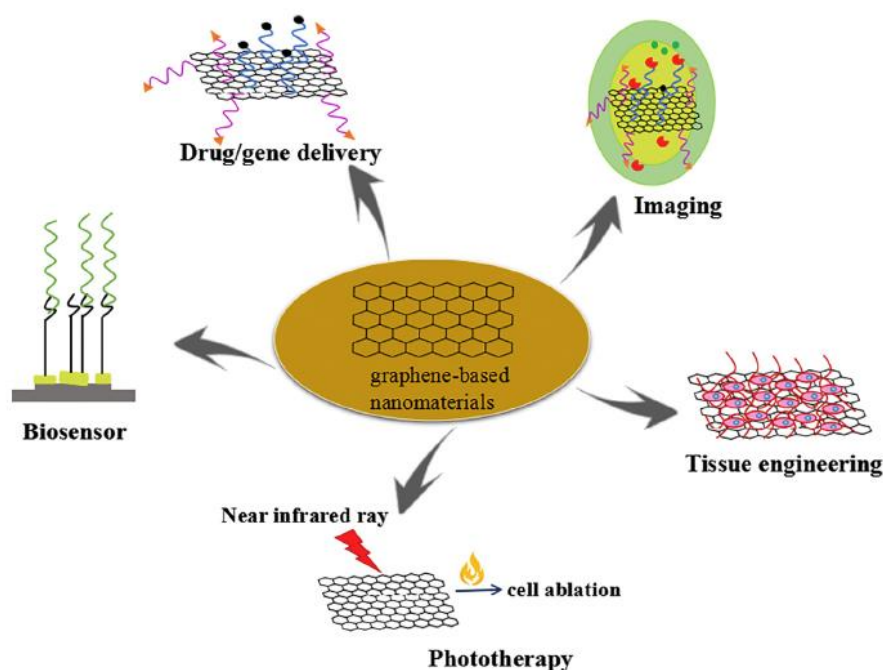


Figura 35 Applicazioni dei nanomateriali basati sul grafene in biomedicina [Qu et al., 2018].

Le eccellenti proprietà elettrochimiche, ottiche e meccaniche rendono il grafene un buon candidato per applicazioni biomediche di biosensing, bioimaging, trasporto di farmaci, fototerapia, ingegneria tissutale. Inoltre l'interfacciamento del grafene con le cellule cerebrali potrebbe essere estremamente vantaggioso ai fini dell'ingegneria neurale [Qu et al., 2018].

L'elevata conduttività elettrica e le proprietà di flessibilità meccanica rendono il grafene un materiale potenzialmente adatto come interfaccia neuronale per funzionalità di stimolazione e registrazione elettrica (figura 36). L'applicazione del grafene nella realizzazione di elettrodi o componenti di stimolazione in dispositivi bioelettronici, può migliorare il funzionamento degli impianti esistenti, superando o affiancando i convenzionali materiali a base di metallo e silicio.

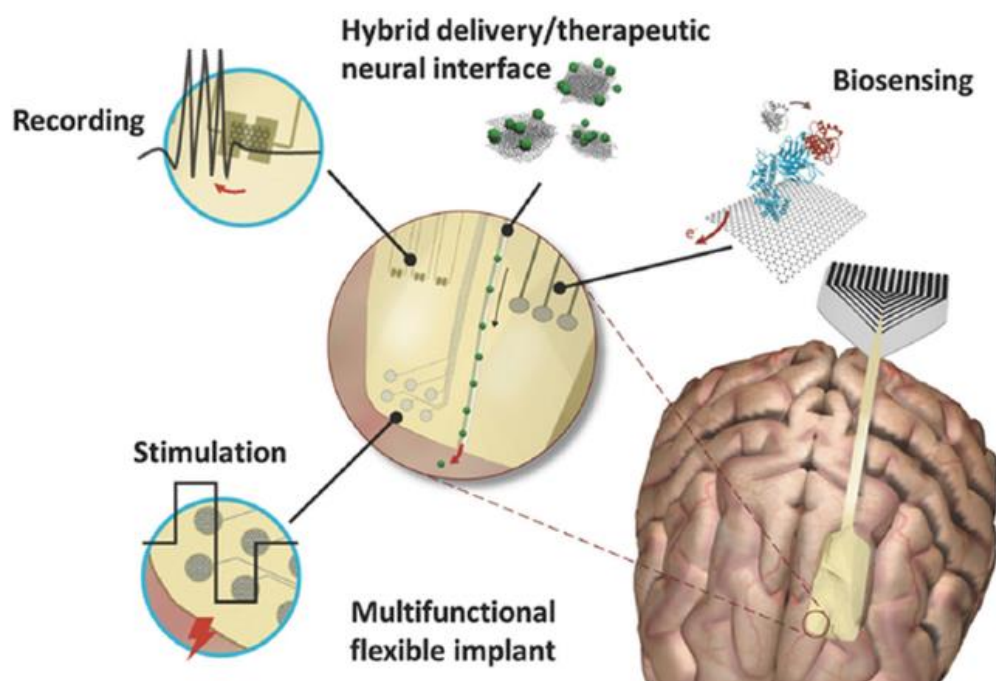


Figura 36 Interfacce neurali a base di grafene per applicazioni di registrazione, stimolazione e biosensing [Kostarelos et al., 2017].

Studi *in vivo* hanno dimostrato che mediante elettrodi a base di grafene è possibile stimolare e registrare l'attività neuronale. Gli elettrodi di grafene producono valori di carica di iniezione leggermente più alti rispetto ai comuni elettrodi in metallo, come oro o platino. Nuovi materiali e composti promettenti sfruttano il grafene per

raggiungere livelli di iniezione di carica fino a decine di mC cm^{-2} , come nel caso dell'applicazione *in vivo* di una sonda flessibile di GO ridotto incorporato in parilene-C [Apollo et al., 2015]. Essa è stata impiegata per stimolare le cellule gangliari della retina *ex vivo* e per registrare l'attività neurale *in vivo* dalla corteccia visiva del gatto. Elettrodi di grafene, completamente trasparenti, sono stati impiantati in topi GCaMP6f, per l'applicazione di approcci di stimolazione elettrica cerebrale e monitoraggio ottico simultaneo dei tessuti neurali [Park et al., 2018].

La capacità di legare o assorbire una varietà di molecole mediante doppi legami coniugati e/o interazioni elettrostatiche, rendono il grafene adeguato per la rilevazione di biomolecole o il rilascio di farmaci. [Georgakilas et al. 2012]. La funzionalizzazione potrebbe consentire al grafene di fungere da piattaforma per il trasporto di biomolecole che di solito non passano attraverso la barriera ematoencefalica [Bramini et al., 2016]. Dispositivi basati su grafene opportunamente funzionalizzato o associato a tecnologie complementari, rappresentano infatti candidati promettenti per sistemi diagnostici di imaging e terapie farmacologiche.

Inoltre la versatilità, le proprietà ottiche ed elettrochimiche e la facilità di funzionalizzazione della superficie grafenica risultano aspetti vantaggiosi per applicazioni di biosensing. L'impiego del grafene può potenziare le funzionalità dei componenti elettronici convenzionali basati su semiconduttori inorganici contribuendo ad aumentare la sensibilità e la selettività di sensori per il rilevamento di molecole biologiche [Reina et al., 2017, Lee et al., 2019].

Il grafene, in combinazione con molti dei materiali tradizionali, potrebbe aumentare la stabilità nel lungo termine degli impianti, promuovendo la crescita e proliferazione cellulare e minimizzando la formazione di tessuto fibroso attorno agli elettrodi. La flessibilità e la resistenza meccanica fanno del grafene un componente ideale per impianti bioelettronici flessibili, come elemento integrante o di rinforzo strutturale, in grado di adattarsi ai tessuti biologici limitando lo stress meccanico e aumentando la durata dell'impianto. La possibilità di realizzare rivestimenti e rinforzi con materiali a base di grafene può migliorare le performance degli impianti tradizionali

in termini di proprietà meccaniche e biocompatibilità [Kostarelos et al., 2017, Reina et al., 2017].

Diversi studi sono stati condotti per investigare la biocompatibilità del grafene *in vitro* e *in vivo*, un aspetto cruciale da valutare nell'identificare candidati idonei per applicazioni cliniche. La letteratura riporta dati discordanti sulla valutazione della biocompatibilità dei materiali grafenici. La discrepanza dei risultati può essere correlata a una molteplicità di fattori, come la scelta dei modelli cellulari e delle condizioni sperimentali, l'eterogeneità dei materiali presenti in commercio e la varietà dei metodi di fabbricazione. Si riscontra infatti che metodo di sintesi, presenza di gruppi funzionali, tipo di ricoprimento, dimensioni, spessore, difetti strutturali incidono in varia misura sulla biocompatibilità [Yang et al., 2013]. In base al materiale di partenza e al tipo di trattamento, il prodotto finale presenta differenti dimensioni, spessore, funzionalizzazione chimica della superficie, producendo una diversa interazione con i sistemi biologici [Bramini et al., 2018, Gurunathan & Kim, 2016].

È stato riportato che il maggior grado di ossidazione, la riduzione delle dimensioni, la possibilità di funzionalizzare i derivati del grafene mediante macromolecole possono contribuire a ridurre citotossicità e risposte infiammatorie, favorendone la biocompatibilità e la stabilità a contatto con i fluidi biologici [Qu et al., 2018, Bramini et al., 2018].

I substrati di grafene mostrano un enorme potenziale come interfacce materiali per dispositivi e strumenti biomedici diretti alla modulazione o al recupero della funzionalità cerebrale. Tuttavia, per essere considerati interfacce neurali affidabili, i substrati derivati dal grafene dovrebbero interagire efficacemente con gli astrociti, favorendo la loro crescita ed evitando reazioni gliotiche avverse. I meccanismi di interazione dei materiali grafenici con neuroni e astrociti sono in corso di studio.

Studi *in vitro* su colture primarie non hanno mostrato nessun cambiamento in vitalità di cellule neuronali e gliali in seguito all'esposizione al grafene [Bramini et al., 2016; Rauti et al., 2016]. Tuttavia, colture neuronali primarie esposte a nanofogli di GO hanno mostrato chiare alterazioni in una serie di percorsi fisiologici e nei processi trasmissione sinaptica. Un'analisi completa degli effetti di esposizione cronica e acuta a ossido di

grafene è stata condotta su colture di neuroni corticali primari di ratto, valutando gli effetti a lungo termine sulla vitalità cellulare e la trasmissione sinaptica. Una volta interiorizzati nelle cellule, si è visto che i nanosheet di grafene si accumulano preferibilmente nei lisosomi. L'esposizione al GO ha causato selettivamente l'inibizione della trasmissione eccitatoria, parallelamente a una riduzione del numero di contatti sinaptici eccitatori ed un potenziamento dell'attività inibitoria. [Bramini et al., 2016; Rauti et al., 2016]. Questo è stato accompagnato da attività autofagocitaria e da alterazioni della dinamica e dell'omeostasi del calcio. Tali risultati mostrano che, sebbene l'esposizione al grafene non influisca sulla vitalità del neurone, ha effetti importanti sulla trasmissione neuronale e sulla funzionalità della rete neurale [Bramini et al., 2016, Rauti et al., 2016].

1.4.3.2 Il grafene e gli astrociti

Nello studio di Chiacchieretta e colleghi, sono state indagate le conseguenze dell'esposizione a lungo termine di astrociti primari di ratto a fogli di grafene e ossido di grafene, dimostrando che questi possono interferire con una varietà di processi intracellulari a seguito della loro interiorizzazione attraverso il percorso endolisosomiale (figura 37) [Chiacchieretta et al., 2018]

Gli astrociti esposti al grafene acquisiscono un fenotipo morfologico più differenziato associato a drammatici riarrangiamenti del citoscheletro. Profonde alterazioni funzionali sono indotte dall'interiorizzazione del GO, inclusa la sovraregolazione dei canali a rettificazione entrante Kir e del trasportatore che media il riassorbimento di glutammato Na⁺-dipendente. Entrambe queste proteine di membrana sono fondamentali nella capacità degli astrociti di controllare l'omeostasi extracellulare. Inoltre, gli astrociti a contatto con il GO promuovono la maturazione funzionale dei neuroni primari in co-coltura inducendo un aumento intrinseco dell'eccitabilità e della densità delle sinapsi GABAergiche. Tali risultati indicano che i nanomateriali di grafene influenzano profondamente la fisiologia degli astrociti *in vitro* con conseguenze sull'attività della rete neuronale. [Chiacchieretta et al., 2018].

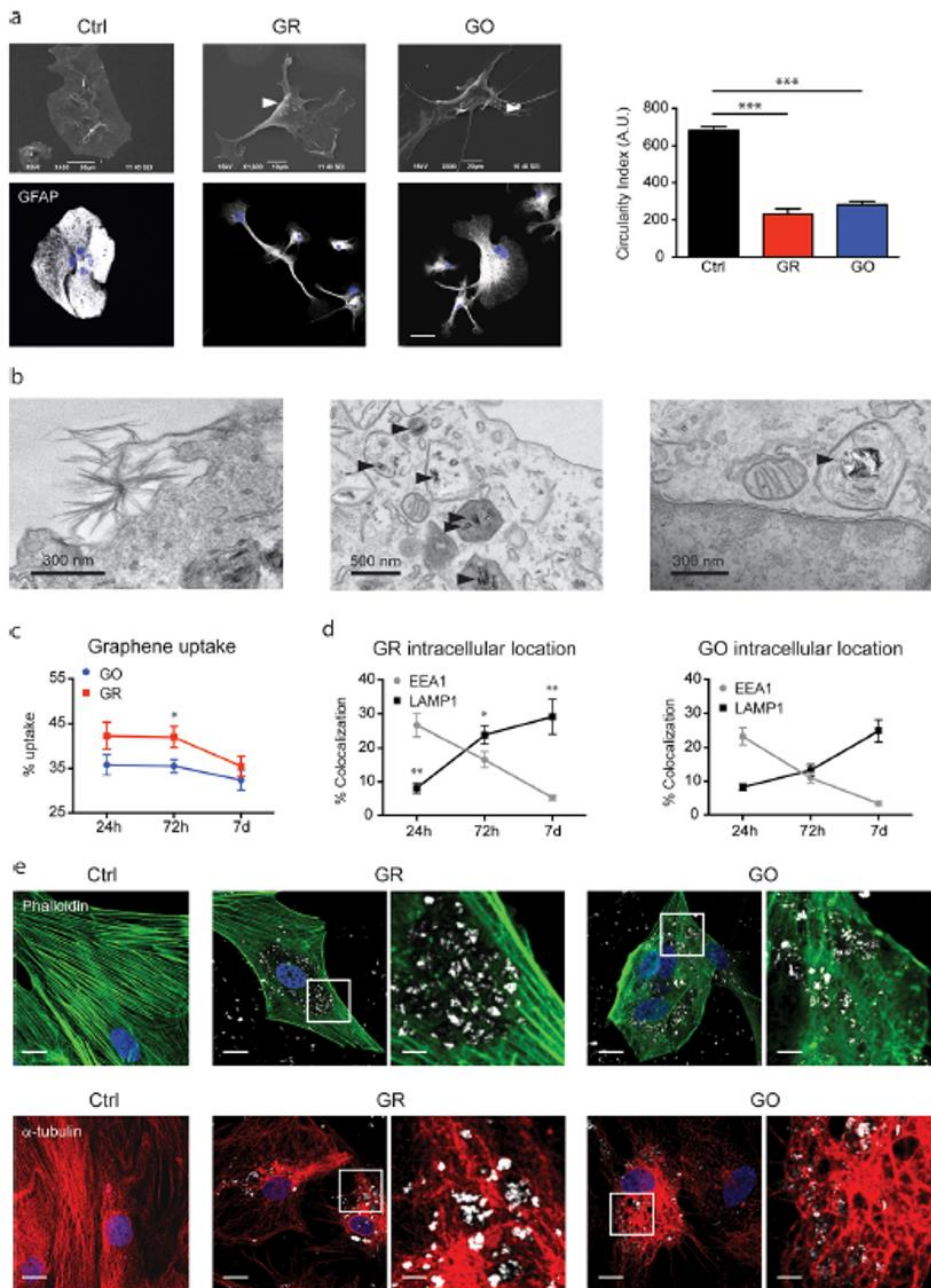


Figura 37 Interazione di grafene e ossido di grafene con astrociti primari [Chiacchieretta et al., 2018].

Nel lavoro di Bramini e collaboratori sono stati indagati i cambiamenti molecolari indotti negli astrociti corticali da grafene a pochi strati (few layer graphene, FLG) e fogli di ossido di grafene (GO). I risultati dimostrano che l'esposizione a FLG e GO non influenza la vitalità o la proliferazione cellulare. Tuttavia, le analisi proteomiche e lipidomiche rivelano alterazioni in diversi processi cellulari, tra cui omeostasi del calcio intracellulare ed il metabolismo del colesterolo [Bramini et al., 2019].

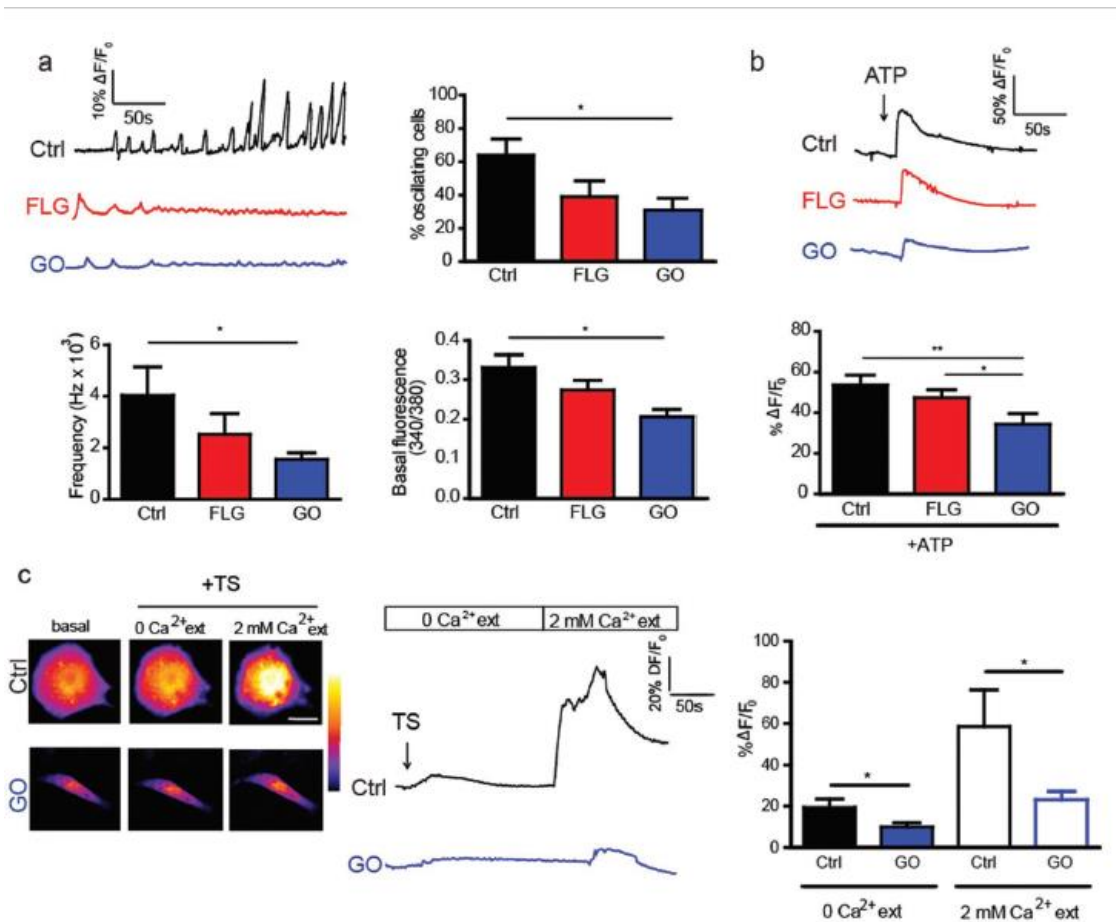


Figura 38 Alterazione della dinamica del calcio intracellulare in astrociti esposti a grafene a pochi strati e ossido di grafene [Bramini et al., 2019].

I processi alterati sia da FLG che da GO includono il rimodellamento del citoscheletro e di proteine leganti i lipidi. L'alterazione nelle proteine del citoscheletro è in linea con il marcato cambiamento di forma osservato in astrociti esposti a nanomateriali grafenici, che acquisiscono un aspetto molto allungato. Un'ampia gamma di specie lipidiche sono sovraregolate o down-regolate in astrociti esposti a grafene. In particolare il colesterolo e il metabolismo dei trigliceridi sono significativamente modificati in seguito all'esposizione di astrociti a GO e FLG. Infatti, l'esposizione al GO altera i segnali spontanei ed evocati di calcio intracellulare ed induce un marcato aumento dei livelli di colesterolo di membrana negli astrociti, causalmente correlato all'alterazione della dinamica del calcio (figura 38) [Bramini et al., 2019].

In un precedente lavoro scientifico condotto dai gruppi di ricerca del CNR ISOF, che hanno collaborato al presente lavoro di tesi, al fine di migliorare l'interazione di GO con le cellule astrogliali cerebrali, si era disegnata una nuova strategia basata sulla modifica chimica dell'ossido di grafene con un fosfolipide sintetico (PL) (figura 39).

L'adesione degli astrociti corticali di ratto primari sui substrati GO-PL aumenta di circa tre volte rispetto a quello su substrati di vetro rivestiti con agenti di adesione standard (ad es. poli-D-lisina, PDL) e rispetto a quello su GO non funzionalizzato (figura 40). Inoltre, gli astrociti cresciuti su GO-PL non hanno mostrato alcuna reattività gliotica significativa, indicando che il materiale non ha causato una reazione infiammatoria dannosa all'interfaccia con le cellule astrogliali (figura 41).

Tali risultati indicavano che l'approccio biomimetico riportato potrebbe essere applicato a dispositivi neuroprotesici per favorire la crescita cellulare ed evitare la formazione di cicatrici gliali negli impianti cerebrali. Inoltre, una migliore adesione potrebbe essere estremamente rilevante nei dispositivi rivolti al rilevamento o alla modulazione dell'attività funzionale delle cellule neurali, e quindi degli astrociti stessi [Durso et al., 2018].

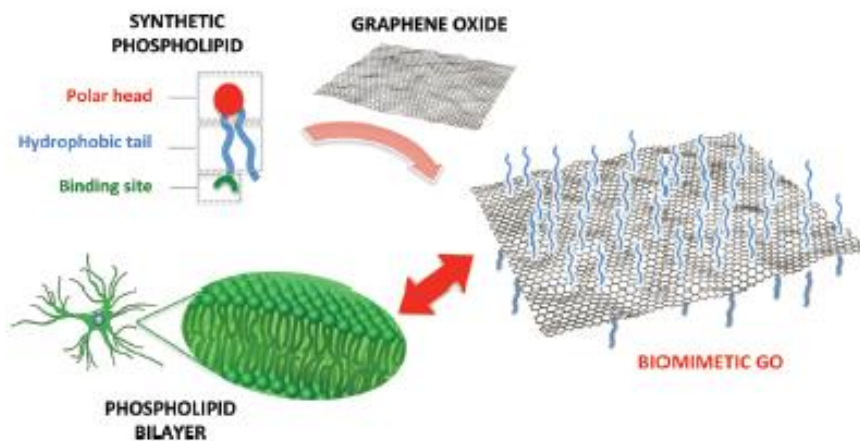


Figura 39 Ossido di grafene funzionalizzato con un fosfolipide sintetico per promuovere l'interazione con la membrana cellulare [Durso et al., 2018].

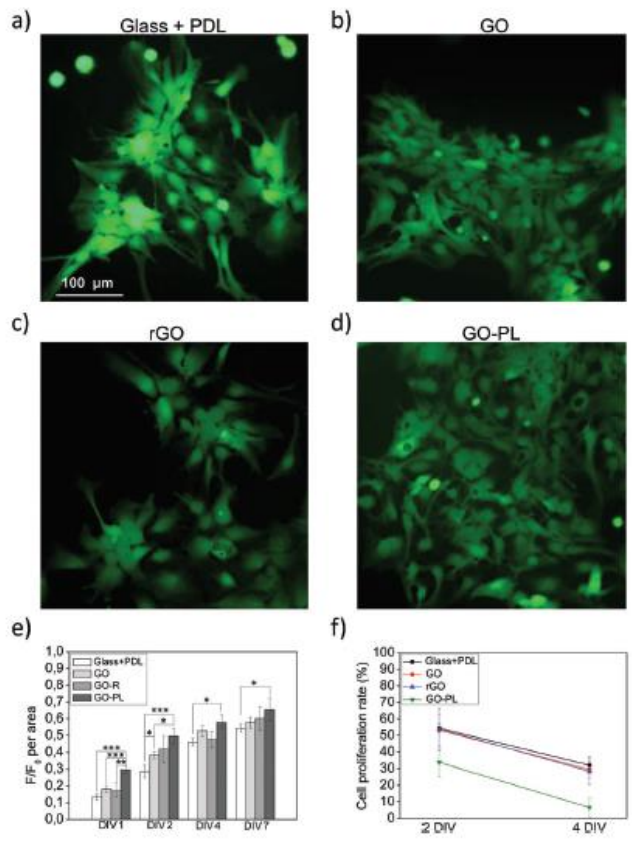


Figura 40 Studio di biocompatibilità relativo a GO, rGO e GP-PL [Durso et al., 2018].

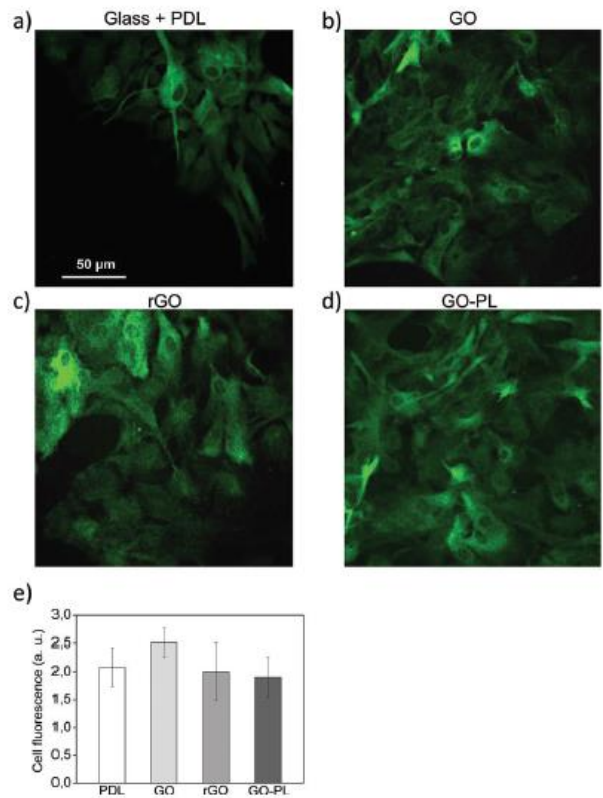


Figura 41 Analisi di immunofluorescenza in astrociti piastrati su PDL, GO, rGO e GO-PL [Durso et al., 2018].

2. SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo di tecnologie biomediche di frontiera dirette alla diagnosi e terapia di disfunzioni del sistema nervoso centrale si basano principalmente su approcci di stimolazione elettrica delle cellule mediante elettrodi posizionati in contatto con il sistema bersaglio. Tuttavia le interfacce neurali attualmente disponibili presentano una serie di importanti limitazioni in termini di risoluzione spazio-temporale, selettività, conformità meccanica rispetto ai tessuti biologici e biocompatibilità nel lungo termine degli impianti.

Inoltre, la maggior parte di queste tecnologie sono state validate nei neuroni, *in vitro* e *in vivo*, ma non è stata prestata sufficiente attenzione al potenziale di questi strumenti nello studio delle cellule gliali, dette astrociti. Queste cellule, sono state a lungo considerate come cellule elettricamente silenti, ma alla luce degli studi compiuti negli ultimi quarant'anni, si è compreso che gli astrociti sono componenti attivi delle reti neurali, e svolgono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi cerebrale e nella modulazione della trasmissione sinaptica. D'altra parte gli astrociti sono le cellule principalmente interessate nella mediazione di risposte infiammatorie che si verificano in seguito ad insulti acuti e cronici del sistema nervoso centrale.

In questo contesto, lo studio dell'interazione tra astrociti e biomateriali risulta essenziale per la progettazione e la validazione di dispositivi biofunzionali, che agiscano come interfacce neurali rivolte allo studio della funzionalità cerebrale, così come alla diagnosi e alla terapia di patologie neurologiche.

Tuttavia, nonostante importanti progressi ottenuti nella comprensione del ruolo degli astrociti, nuovi biomateriali e tecnologie sono necessari nella prospettiva di realizzare dispositivi biocompatibili e flessibili, in grado di promuovere la crescita di astrociti e modulare selettivamente la funzionalità delle cellule gliali. Inoltre, sono ancora poche le evidenze riguardanti lo studio della risposta astrogliale a stimoli fisici, come stimoli elettrici e ottici.

Una letteratura emergente dimostra la capacità degli astrociti di rispondere a stimolazioni elettriche ed ottiche ottenute attraverso l'utilizzo di dispositivi che integrano materiali a base di carbonio ed in particolare materiali semiconduttori organici [Borrachero-Conejo et al., 2019, Benfenati et al., 2014]. D'altra parte, tra i diversi materiali a base di carbonio, il grafene e i suoi derivati hanno mostrato interessanti proprietà quali flessibilità, conducibilità elettrica e termica, resistenza meccanica, trasparenza, facilità di funzionalizzazione della superficie. Inoltre, dati recenti dimostrano come nanofoglietti di grafene agiscano positivamente sulla funzionalità astrogliale, migliorando le proprietà omeostatiche espresse da queste cellule *in vitro* [Bramini et al., 2019, Chiacchieretta et al., 2018].

Sulla base di queste premesse, lo scopo del mio lavoro di tesi si colloca nell'obiettivo più generale di sviluppare e validare strumenti e dispositivi innovativi destinati alla stimolazione e al controllo dell'attività astrogliale.

In particolare, l'obiettivo che ci siamo posti è stato quello di studiare:

1. l'impatto di materiali nanostrutturati a base di grafene sull'adesione e la crescita di cellule astrogliali
2. l'effetto della stimolazione elettrica sulla funzionalità degli astrociti, mediante dispositivi a base di grafene

In questa prospettiva ho sviluppato le mie attività sperimentali presso i laboratori di ricerca dell'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISOF-CNR, Bologna), sotto la supervisione della Dott.ssa Valentina Benfenati e della Dott.ssa Emanuela Saracino.

In collaborazione con i ricercatori del gruppo del Dott. Vincenzo Palermo e della Dott.ssa Manuela Melucci, del ISOF-CNR, ho avuto la possibilità di indagare il comportamento dell'ossido di grafene e dei suoi derivati funzionalizzati come interfacce per la crescita e il differenziamento cellulare astrogliale e di investigare gli effetti della stimolazione elettrica di astrociti *in vitro* operata tramite l'utilizzo di diversi dispositivi a base di grafene.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture primarie di astrociti neocorticali di ratto

Per coltura cellulare primaria si intende una coltura originata da un espianto di tessuto direttamente isolato da un organismo vivente e costituita da cellule coltivate in vitro per un periodo di tempo e un numero di divisioni limitati, in presenza di fattori di crescita.

Le colture primarie di astrociti neocorticali sono state preparate da ratti Sprague Dawley (Charles River, Italia), effettuando l'estrazione delle cellule il giorno stesso della nascita o al massimo il giorno successivo (P0-P2) [Mccarthy, 1980]. La preparazione delle colture cellulari è stata condotta presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con l'autorizzazione della commissione bioetica dell'Università di Bologna, in accordo con la legge italiana sulla protezione degli animali da laboratorio (Protocollo n° 715/2016).

Le operazioni di preparazione sono state svolte lavorando sotto una cappa a flusso laminare dotata di filtri HEPA, che assicura la protezione dell'operatore e del campione e consente la manipolazione delle cellule in condizioni di sterilità.

La procedura di estrazione di astrociti corticali prevede la dissociazione meccanica di cellule dalla corteccia cerebrale dell'animale. Dopo aver reciso la testa del ratto ed averla sterilizzata in etanolo, essa è stata fissata su un supporto di cera mediante un ago. Utilizzando strumenti sterili, è stata asportata la pelle e praticata un'incisione in modo da rimuovere la scatola cranica. Tamponando il tessuto con un bastoncino di cotone, si è cercato di togliere il più possibile le meningi ed i fibroblasti. Successivamente, con l'ausilio di una spatola, sono stati separati i due emisferi ed è stata prelevata la regione superficiale della corteccia per isolare la tipologia cellulare d'interesse. Il frammento espiantato è stato depositato in un tubo Falcon contenente il mezzo di coltura, tritato ed omogeneizzato. Infine il materiale cellulare è stato filtrato e disperso in una fiasca di polistirene, contenente il terreno di coltura. Il mezzo di coltura, adatto alla crescita di astrociti, è composto da DMEM (Dulbecco's

Modified Eagle Medium) (Gibco-BRL) addizionato del 15% di siero fetale bovino (FBS), penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 mg/ml) (Gibco-BRL).

Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore, in atmosfera umidificata ad una temperatura di 37 °C e CO₂ al 5%, per 3 settimane, fino al raggiungimento della confluenza. Il terreno di coltura veniva cambiato ogni 2-3 giorni. Prima del cambio del mezzo, se necessario le colture venivano sottoposte ad agitazione meccanica, in modo da distaccare la microglia adesa alla superficie dello strato di astrociti.

In seguito, le cellule sono state piastrate sui dispositivi d'interesse e mantenute in coltura con mezzo al 10% di FBS. La piastratura consiste nella tripsinizzazione, cioè il distacco delle cellule mediante l'azione enzimatica della tripsina, a cui segue la conta cellulare per determinare il volume di sospensione cellulare da piastare, e la semina sulla superficie del campione. Dopo aver posto le cellule in incubazione con 1 ml di tripsina allo 0.4% (Gibco-BRL) ed EDTA allo 0.02% (Sigma) per 5 minuti, il materiale cellulare è stato trasferito in un tubo Falcon e sottoposto a centrifugazione (per 5 minuti a 960 rpm). Previa inattivazione della tripsina con del siero, il sovrantante è stato rimosso ed il pellet risospeso in 1 ml di terreno, di cui una piccola quantità è stata impiegata per la conta cellulare. La conta cellulare è stata effettuata mediante il metodo della camera di Burker.

Per gli esperimenti di Calcium imaging gli astrociti sono stati piastrati in concentrazione elevata su dispositivi a base di grafene.

3.2 Preparazione dei campioni ITO-GO

La preparazione dei campioni di ossido di grafene su substrati di ITO/vetro è stata effettuata dalla Dott.ssa Alessandra Scidà ed il Dott. Emanuele Treossi del gruppo del Dott. Vincenzo Palermo, dell'istituto ISOF-CNR.

L'ossido di grafene utilizzato per la preparazione dei campioni è stato ottenuto tramite metodo Hummer modificato. I campioni di ITO su vetro con dimensioni 2,5 cm x 2,5 cm sono stati puliti con sonicazione a 60°C in acetone e successivamente in alcool isopropilico, seguiti da un trattamento di pulizia con plasma di aria. Su

questi campioni sono state depositate le soluzioni acquose di ossido di grafene tramite spin-coating a 2000 RPM.

3.3 Sintesi e funzionalizzazione del GO

La preparazione dei substrati ITO-GO funzionalizzati è stata effettuata dal Dott. Cristian Bettini, del gruppo della Dott.ssa Manuela Melucci, dell'istituto ISOF-CNR. In breve, la superficie dell'ossido di grafene è stata funzionalizzata con silano (SiH₄), mediante sintesi in etanolo.

3.3 Test di vitalità cellulare: FDA

La vitalità cellulare è stata indagata mediante il saggio della fluoresceina diacetato (FDA).

Il saggio della FDA è un test qualitativo utilizzato per la differenziazione di cellule vive da cellule morte. La FDA è una molecola non fluorescente, che viene idrolizzata dall'attività enzimatica delle esterasi in fluoresceina fluorescente. Questa funzionalità è presente solo nelle cellule vive che quindi mostrano fluorescenza, emettendo luce verde quando vengono esposte a luce blu. Le cellule morte non possono accumulare o idrolizzare FDA, quindi non emettono fluorescenza.

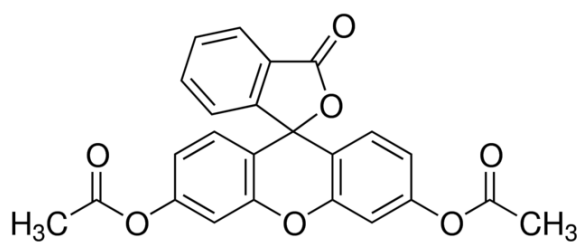


Figura 42 Struttura chimica della fluoresceina diacetato.

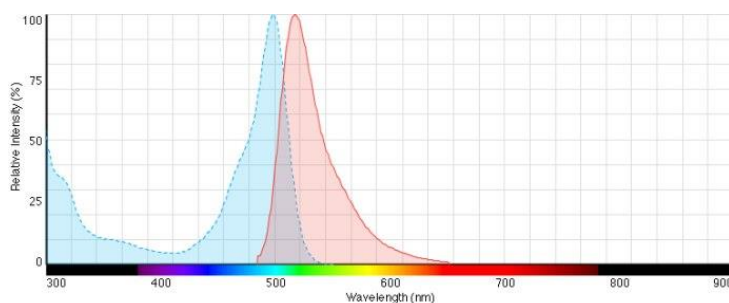


Figura 43 Spettro di fluorescenza della fluorosceina diacetato.

Ciascun campione è stato caricato con FDA (Sigma, Milano, Italia) e Hoechst 33342 (1:2000) (un marcatore del nucleo cellulare), diluiti in DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (Gibco-BRL). I campioni sono stati posti in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente e risciacquati con DPBS per rimuovere FDA in eccesso. Le immagini sono state acquisite mediante un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80i, equipaggiato con obiettivi 20X e 50X, un filtro FITC nel verde ed un filtro DAPI nel blu, e mediante un microscopio confocale Fluo Spin-up Crisel Instrument, equipaggiato con un obiettivo 40X, un filtro GFP nel verde ed un filtro DAPI nel blu.

3.4 Calcium imaging e stimolazione elettrica

Le variazioni di concentrazione di calcio intracellulare $[Ca^{2+}]_i$ in astrocita sono state misurate tramite la tecnica del Calcium imaging.

Gli esperimenti di Calcium imaging sono stati effettuati a 5 DIV. Come indicatore di fluorescenza è stata utilizzata la molecola Fluo4-AM (1 mM) (Life Technologies, Milano, Italia). L'accoppiamento della molecola Fluo 4 con l'estere acetossimetilico (AM) è necessario per favorire il passaggio della sonda attraverso la membrana cellulare. Entrata nella cellula, la molecola Fluo4-AM non fluorescente viene tagliata dalle esterasi, rilasciando Fluo4 libero che andrà a legare il calcio citosolico. L'eccitazione della molecola produce un aumento dell'intensità di fluorescenza proporzionale alla concentrazione di calcio legato.

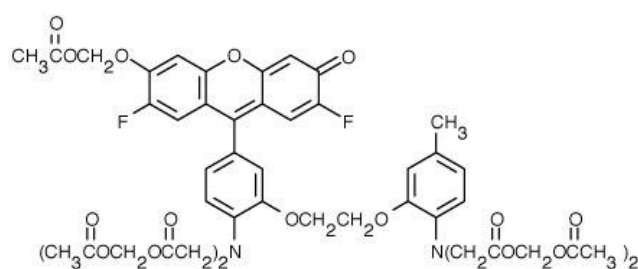


Figura 44 Struttura chimica della molecola Fluo4-AM.

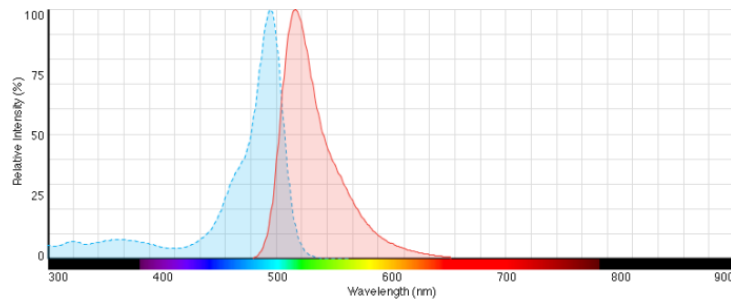


Figura 45 Spettro di fluorescenza della molecola Fluo-4 (eccitazione a 494 nm/emissione a 506 nm).

Prima della misura, gli astroцитi piastrati sulla superficie del dispositivo sono stati caricati con Fluo4 in concentrazione 2 μM e acido pluronico, disciolti in soluzione salina esterna standard. Il campione è stato posto in incubazione per 40 minuti, a temperatura ambiente e successivamente risciacquato con soluzione salina esterna.

La misurazione di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è stata condotta impiegando un microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse Ti-S) equipaggiato con un obiettivo 40X ed appropriati filtri nel verde. Il protocollo di stimolazione LED prevedeva una lunghezza d'onda di eccitazione di 470 nm, con impulsi di luce LED di durata 200 ms ad una frequenza di 2 Hz, per una durata totale di registrazione di 5 minuti. L'acquisizione dei dati è stata effettuata utilizzando il software MetaFluor (Molecular Devices).

La stimolazione elettrica è stata applicata mediante un sistema 2612A Dual-Channel System Sourcemeter Instrument (Keithley), utilizzando uno specifico protocollo di voltaggio.



Figura 46 Sistema 2612A Dual-Channel System Sourcemeter Instrument (Keithley).

L'esposizione delle cellule al campo elettrico esterno avveniva tramite l'applicazione di una differenza di potenziale fra un elettrodo di stimolazione (in

oro) e un elettrodo di riferimento (in argento, ricoperto da cloruro di argento) immerso nel bagno.

Il protocollo di tensione prevedeva la somministrazione di uno stimolo continuo di tensione crescente da 0.1 V a 0.9 V, per una durata di 85 secondi, applicato a 30 secondi dall'inizio dell'esperimento.

L'inibitore TPEN (100 mM) è stato diluito in soluzione salina esterna standard ed aggiunto al dispositivo in seguito ad un risciacquo.

3.5 Analisi statistica

La rappresentazione e l'analisi statistica dei dati sono state svolte in Origin 8.5.

Per gli esperimenti di Calcium imaging, il rapporto fra l'intensità di fluorescenza all'istante temporale t e l'intensità di fluorescenza all'istante temporale iniziale t_0 , direttamente correlato alla variazione di $[Ca^{2+}]_i$, è stato registrato per tutta la durata dell'acquisizione. I dati sono stati confrontati statisticamente utilizzando il test ANOVA ad una via, con post-test di Bonferroni per il confronto delle medie. I dati derivano da almeno 3 esperimenti indipendenti effettuati in triplicato.

4. ANALISI DEI RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratterizzazione SEM dei substrati

Al fine di valutare le proprietà morfologiche dei campioni a base di grafene, preparati come descritto nei materiali e metodi (figura R1A-B) è stata effettuata una caratterizzazione al microscopio elettronico a Scansione (Scanning electron Microscopy, SEM) (figura R1C-E). La caratterizzazione SEM dei campioni di GO depositato su ITO/vetro mostra che la deposizione tramite spin-coating di ossido di grafene in soluzione acquosa a concentrazione 1 g/L consente di ottenere un ricoprimento parziale della superficie (figura R1C). Depositando più strati di ossido di grafene (GO 2g/L X10) si raggiunge un maggior ricoprimento della superficie (figura R1D-E), con spessore del film di alcuni nm.

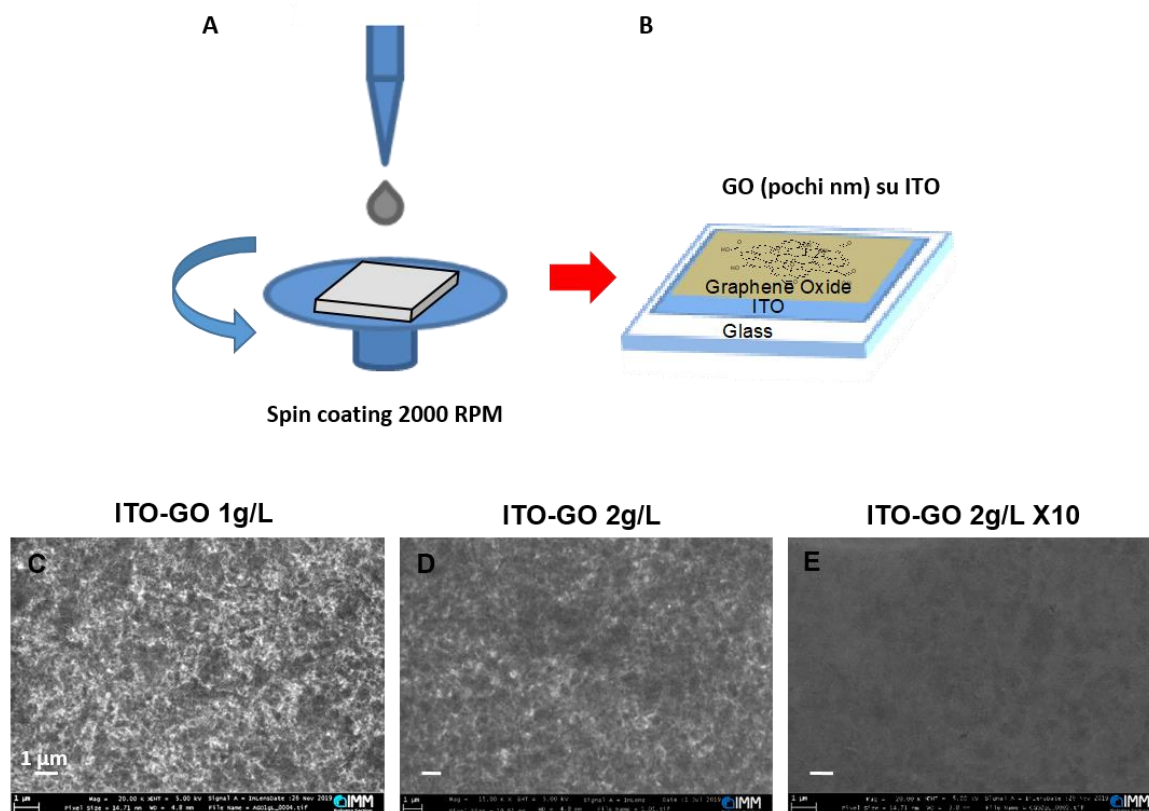


Figura R1 A) Preparazione dei substrati ITO-GO mediante la tecnica dello spin-coating; B) Deposizione di ossido di grafene su vetro/ossido di indio stagno. Caratterizzazione SEM di C) ITO-GO 1g/L, D) ITO-GO 2g/L, D) ITO-GO 2g/L X10.

4.2 Biocompatibilità del dispositivo ITO-GO

Il primo passo del presente studio è stato quello di valutare la biocompatibilità del dispositivo ITO-GO con astrociti corticali primari. Gli astrociti sono stati piastrati sui dispositivi ITO-GO e sono stati eseguiti test di vitalità cellulare FDA e Hoescht. Le immagini relative alle diverse condizioni analizzate mostrano astrociti vitali piastrati su ITO, ITO-GO 1g/L, ITO-GO 2g/L, ITO-GO 2g/L X10 e ITO-rGO 2g/L dopo cinque giorni dalla piastratura (5 giorni in vitro, days in vitro, DIV). L'osservazione morfologica ha rivelato che la morfologia prevalentemente osservata per gli astrociti cresciuti sui dispositivi analizzati era la forma poligonale piatta tipicamente osservata negli astrociti primari *in vitro* (Benfenati et al., 2010; 2014; Borrachero-Conejo et al., 2019). Tuttavia nelle cellule piastrate su ITO, ITO-GO 1g/L, ITO-GO 2g/L si evidenzia anche la presenza di cellule che esprimevano processi citoplasmatici e ramificazioni che non sono evidenti in ITO-GO 2g/LX10 ed in ITO-rGO 2g/L.

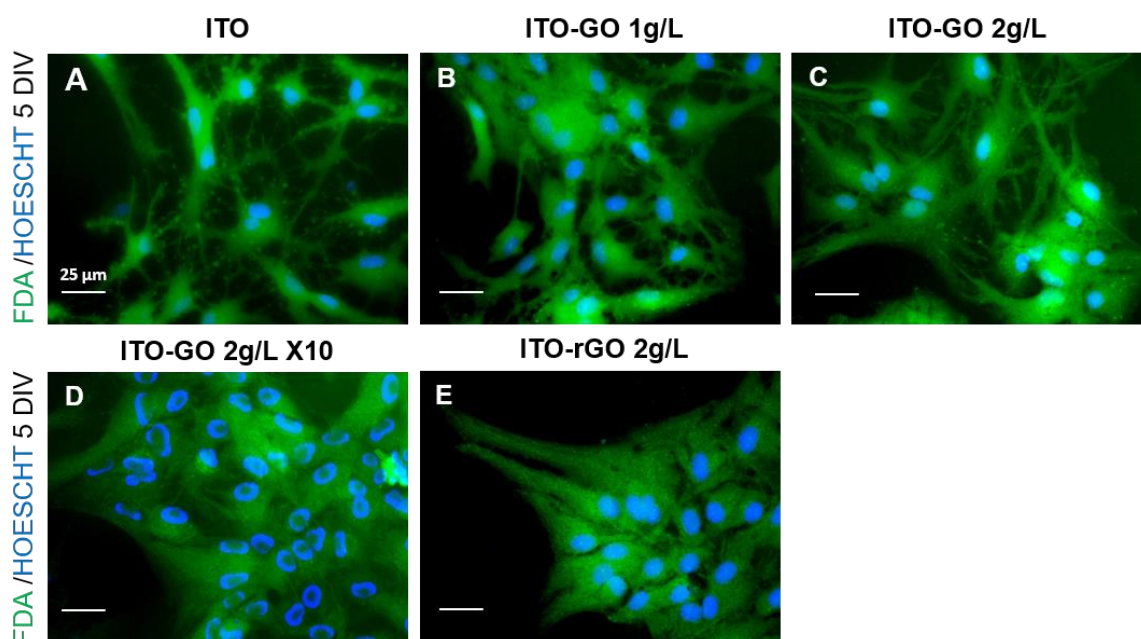


Figura R2 Studio di biocompatibilità del dispositivo ITO-GO. Immagini a fluorescenza di astrociti sottoposti a saggio FDA, piastrati su A) ITO, B) ITO-GO 1g/L, C) ITO-GO 2g/L, D) ITO-GO 2g/L X10, E) ITO-rGO 2g/L, a 5 DIV.

I dati erano in accordo con il precedente studio condotto dallo stesso gruppo di ricerca, in cui era stato evidenziato che il GO e il rGO erano substrati favorevoli alla

adesione degli astrociti, e non necessitavano di ulteriori trattamenti. Nel presente studio si evidenzia come i diversi spessori sembrano indurre un effetto sulla morfologia degli astrociti. Analisi statistica del tipo analisi di Scholl, attualmente in fase di elaborazione, chiarirà la significatività di questa osservazione.

Nello studio precedentemente condotto si dimostrava come la funzionalizzazione dell'ossido di grafene con un fosfolipide migliorasse l'adesione e la vitalità cellulare di astrociti primari in coltura, senza causare reazioni gliotiche [Durso et al., 2018]. Al fine di verificare se l'interazione della membrana cellulare con la catena alifatica e idrofobica fosse responsabile della migliore adesione cellulare degli astrociti, abbiamo effettuato esperimenti in cui le cellule sono state piastrate lo stesso giorno su substrati di ossido di grafene (GO) funzionalizzato con silano ed è stata effettuata la conta delle cellule a 3 DIV e 7 DIV.

Inoltre, come descritto in figura R1, al fine di ottenere un dispositivo in grado di stimolare elettricamente le cellule, le interfacce a base di GO sono state depositate per spin coating su substrati di vetro e ITO. L'istogramma che riporta il numero dei nuclei di cellule vive (verdi) contate per area, riferito a ciascuna condizione (figura R3G), indica che, a 3DIV, la sopravvivenza degli astrociti piastrati su ITO-GO-silano è significativamente maggiore rispetto a quella osservata su ITO-silano e ITO-GO. Al contrario la presenza di GO non era condizione sufficiente per una migliore adesione rispetto ai substrati di solo vetro ed ITO silanizzato. Per tempi più lunghi, a 7 DIV, ITO-GO-silano e ITO-GO mostravano un numero di cellule superiore rispetto a ITO. Questi dati nel loro complesso mostrano l'eccellente capacità del GO di essere usato come substrato biocompatibile per l'adesione e la crescita di astrociti corticali primari. In questo contesto è ampiamente riconosciuto che la somiglianza chimica tra la membrana cellulare e la biointerfaccia organica, nonché le proprietà meccaniche come la morbidezza, promuovono l'interazione favorevole tra materiali organici e cellule neurali. D'altra parte i risultati mostrano come nei substrati ITO-silano e ITO GO la crescita fosse minore che nei substrati ITO-GO-silano.

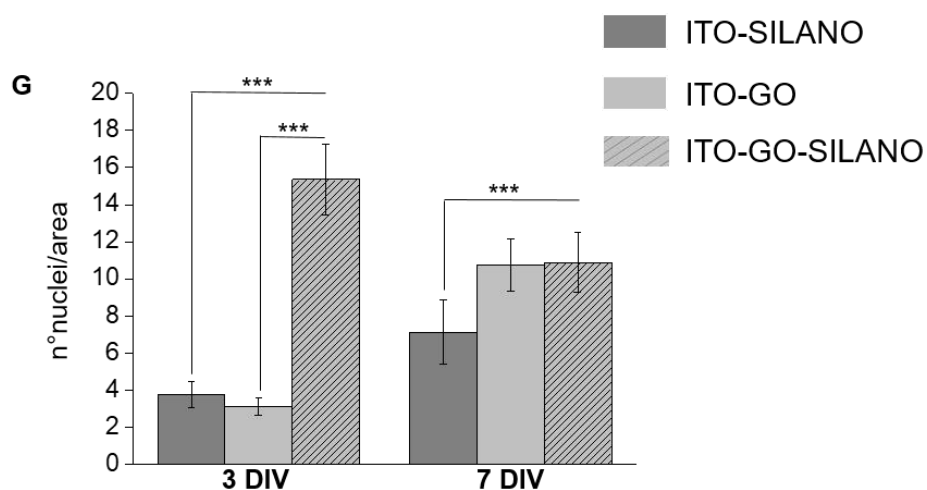
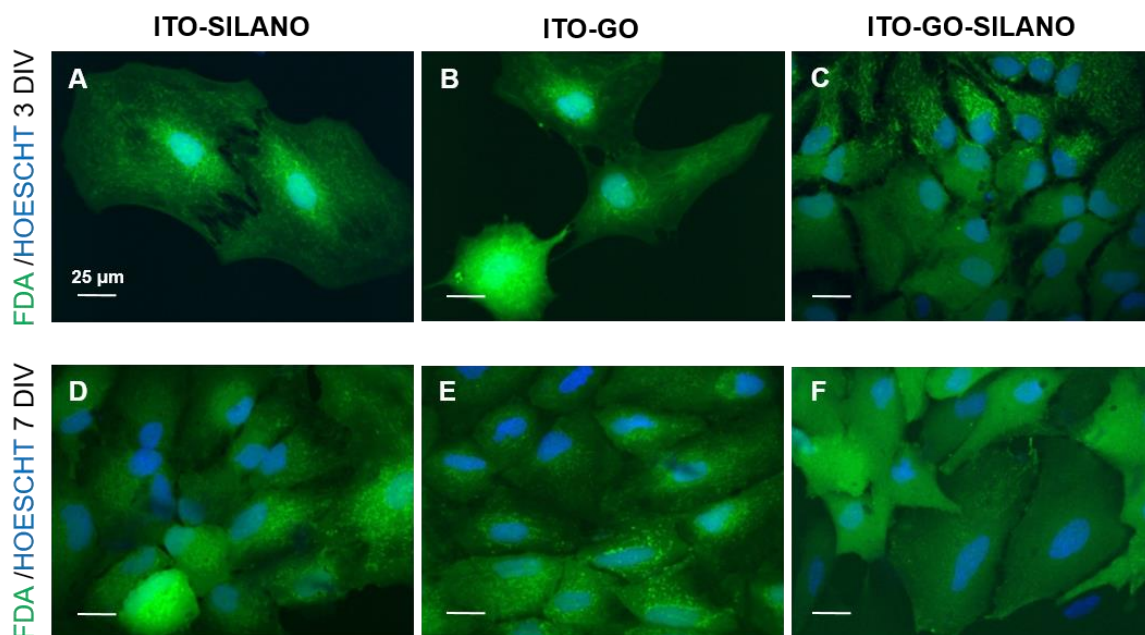


Figura R3 Studio di biocompatibilità del dispositivo ITO-GO funzionalizzato con silano. Immagini a fluorescenza di astroцитi sottoposti a saggio FDA, piastrati su A, D) ITO-SILANO, B, E) ITO-GO, C, F) ITO-GO-SILANO, a 3 DIV (A-C) e 7 DIV (D-F). Istogramma rappresentante il numero di nuclei/area relativo ad astroцитi piastrati su ITO-SILANO, ITO-GO e ITO-GO-SILANO, a 3 DIV e 7 DIV.

Questi risultati seppur preliminari mostrano nel loro complesso come la funzionalizzazione con silano del GO su ITO potrebbe essere un metodo per migliorare l'interfaccia cellula dispositivo e quindi favorire interazione fisica del

dispositivo con la cellula migliorandone le proprietà di sensing e di modulazione dell'attività cellulare funzionale.

A tal fine sono in fase di studio ed elaborazione i dati riguardanti la caratterizzazione chimico-fisica del dispositivo e della sua interfaccia.

4.3 La stimolazione elettrica mediante ITO-GO induce risposte di calcio in astrociti

Date le proprietà elettriche e meccaniche del grafene e dei suoi derivati, è stata ipotizzata la possibilità di modulare l'attività astrogliale mediante differenti dispositivi a base di ossido di grafene: ITO, ITO-GO 1g/L, ITO-GO 2g/L, ITO-GO 2g/L X10 e ITO-rGO 2g/L.

In tal senso, è stato studiato l'effetto della stimolazione elettrica extracellulare applicata mediante i diversi dispositivi ITO-GO sulla dinamica del calcio intracellulare in astrociti.

Uno schema del setup sperimentale è mostrato nelle figure R4C, D. Le cellule, piastrate sui dispositivi, sono state incubate con Fluo-4-AM e sono stati eseguiti esperimenti di imaging del calcio, a 5 giorni dalla ripiastratura sui dispositivi (5 DIV), in soluzione salina esterna standard. Gli esperimenti di imaging del calcio sono stati effettuati secondo il protocollo descritto nei materiali e metodi. La figura R4B mostra la tipica immagine fluorescente di astrociti caricati con il Fluo-4AM, durante uno degli esperimenti di calcium imaging effettuati.

Il protocollo di stimolazione elettrica applicato al dispositivo prevedeva la somministrazione di una rampa di tensione continua crescente da 0.1 a 0.8 Volt, di durata 85 secondi, a 30 secondi dall'inizio dell'esperimento.

La tensione applicata ha lo scopo di fornire la stimolazione elettrica all'interfaccia dispositivo-astrociti, generando una caduta di potenziale fra l'elettrodo di stimolazione, mantenuto a potenziale maggiore, e l'elettrodo di riferimento immerso nel bagno, mantenuto a potenziale minore, posti in configurazione diodo.

Il rapporto tra l'intensità della fluorescenza in ciascun punto temporale (F_t) e la fluorescenza iniziale (F_{t0}), che è direttamente correlato alla variazione di $[Ca^{2+}]_i$

[Borrachero-Conejo et al., 2019], è stato continuamente registrato durante l'esperimento.

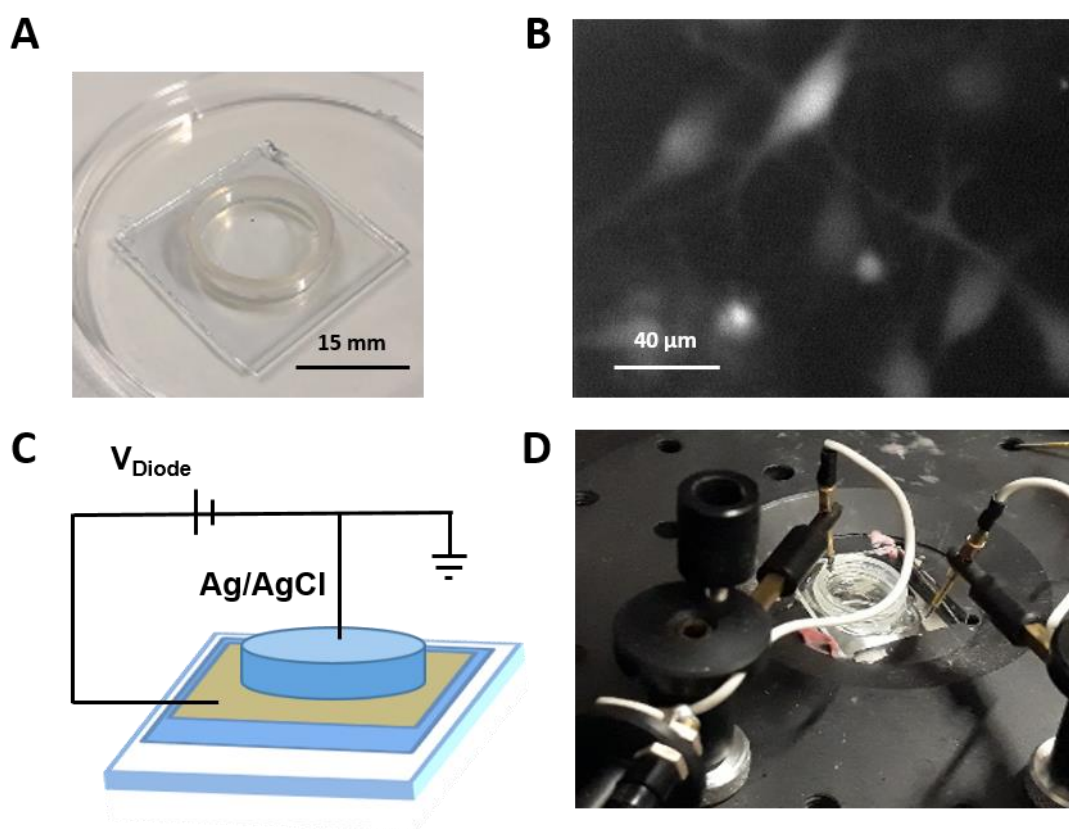


Figura R4 A) Dispositivo ITO-GO, dove sono stati piastrati gli astrociti; B) Immagine a fluorescenza di astrociti caricati con Fluo-4; C) Schema circuitale del dispositivo e applicazione del voltaggio; D) Immagine dell'apparato sperimentale per la stimolazione elettrica di astrociti *in vitro*.

La figura R5 mostra la risposta tipica osservata nelle cellule astrogliali prima e dopo l'applicazione del protocollo di stimolazione elettrica, dove il valore F_t/F_{t_0} varia nel tempo, in funzione della concentrazione di calcio intracellulare legato al fluoroforo Fluo4-AM, e quindi di $[Ca^{2+}]_i$.

Le tracce di fluorescenza caratteristiche visualizzate in astrociti piastrati su ITO descrivono un comportamento di tipo oscillatorio, con veloci ma piccoli incrementi del segnale di calcio, tipicamente osservati quando il fenomeno dell'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ è dovuto al rilascio di calcio intracellulare dai depositi citoplasmatici (figura R5A) [Bazargani & Attwell, 2016].

D'altra parte, la maggior parte delle cellule cresciute su ITO-GO 1g/L, ITO-GO 2g/L, ITO-GO 2g/L X10 rispondevano alla stimolazione elettrica con un lento

incremento nel segnale di $[Ca^{2+}]_i$, tipicamente osservato quando il fenomeno è dovuto all'influsso di calcio extracellulare [Benfenati & Ferroni, 2010; Borrachero-Conejo et al., 2019; Bazargani & Attwell, 2016].

Si noti inoltre come la variazione della concentrazione di calcio intracellulare $[Ca^{2+}]_i$ indotta dalla stimolazione elettrica lenta in astrociti cambiano in relazione a concentrazione, spessore e riduzione dell'ossido di grafene (figure R5 B-D).

Si deduce che a maggiore è la concentrazione dell'ossido di grafene e maggiore è lo spessore del substrato, minore è il tempo di picco, quindi più veloce è la dinamica della risposta (figure R5 B-D).

La risposta delle cellule su rGO mostra un comportamento simile a quello osservato su ITO, con veloci e oscillatori incrementi nel segnale di calcio, tipicamente osservati quando il fenomeno è dovuto al rilascio di calcio dagli stores citoplasmatici. L'ampiezza delle oscillazioni in rGO è maggiore a confronto con ITO, in linea con l'elevata conducibilità del rGO, ottenuta mediante processi di riduzione dell'ossido di grafene (figura R5E).

L'istogramma in figura R6A riporta la frazione percentuale di cellule che rispondono alla stimolazione elettrica con un incremento di fluorescenza superiore al 2%. Si evince che il numero di cellule rispondenti è superiore sui dispositivi ITO-GO rispetto ad ITO, ed in particolar modo risulta maggiore su ITO-GO 1g/L.

In figura R6B è mostrato l'istogramma relativo alla massima variazione di fluorescenza registrata nelle cellule rispondenti, dopo l'applicazione dello stimolo elettrico. Si riscontrano differenze statisticamente significative in ITO-GO 1g/L e ITO-GO 2g/L X10 rispetto ad ITO.

L'istogramma in figura R6C rappresenta la quantificazione del numero di picchi di fluorescenza visualizzati in cellule rispondenti, nelle varie condizioni. Si evidenziano differenze significative fra ITO e ITO-GO 1g/L, ITO-GO 2g/L, ITO-GO 2g/L, ITO-GO 2g/L X10, mentre non risultano differenze significative fra ITO e ITO-rGO.

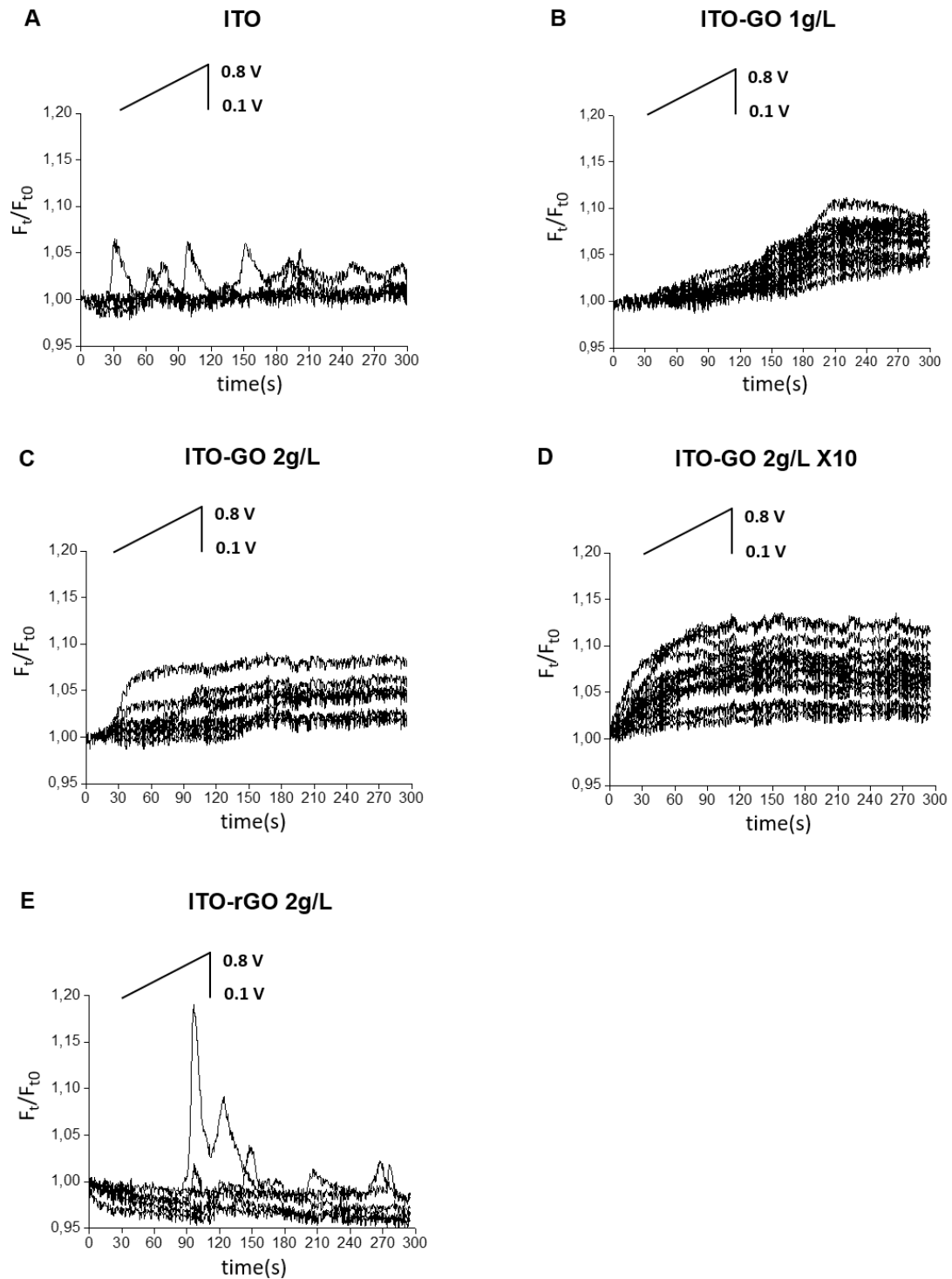


Figura R5 Tracce rappresentative di Calcium imaging, raffiguranti i valori medi di fluorescenza nel tempo normalizzati rispetto al valore di fluorescenza iniziale, in risposta all'applicazione del protocollo di voltaggio (da 0.1 a 0.8 Volt, a 30 secondi dall'inizio dell'esperimento, per una durata di 85 secondi), in ciascuna condizione. Le variazioni di fluorescenza riflettono le variazioni di $[Ca^{2+}]_i$ in astrocita.

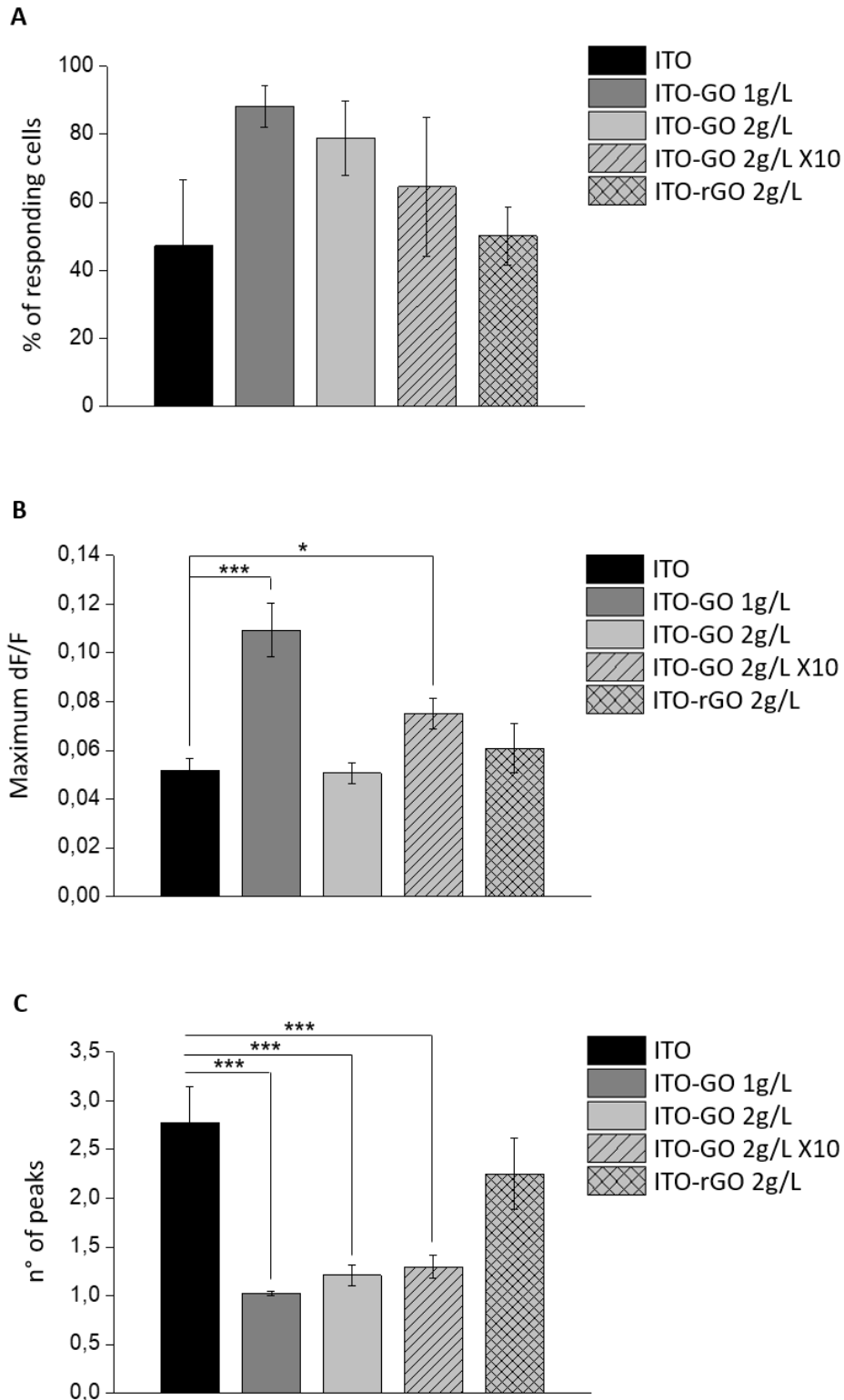


Figura R6 Istogrammi rappresentati A) la frazione percentuale di cellule rispondenti alla stimolazione elettrica, B) la variazione di fluorescenza massima, C) il numero di picchi di fluorescenza, in ciascuna condizione. I dati sono rappresentati in termini di media \pm SEM e derivano da almeno 3 esperimenti indipendenti per condizione. (One-way ANOVA, *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Per confermare i dati sopra descritti, è stata successivamente eseguita un'analisi farmacologica della risposta indotta dall'elettrostimolazione. Sono state analizzate le risposte astrogliali in condizioni di soluzione salina esterna standard (CTRL), in soluzione extracellulare priva di calcio ($0[Ca^{2+}]_o$), ed in presenza di un chelante del calcio intracellulare (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinilmethyl)-1,2-ethanediamine, TPEN, 2mM), nei differenti dispositivi. Le tipiche tracce rappresentative della variazione di fluorescenza ottenute nelle tre condizioni sono riportate in figura R7.

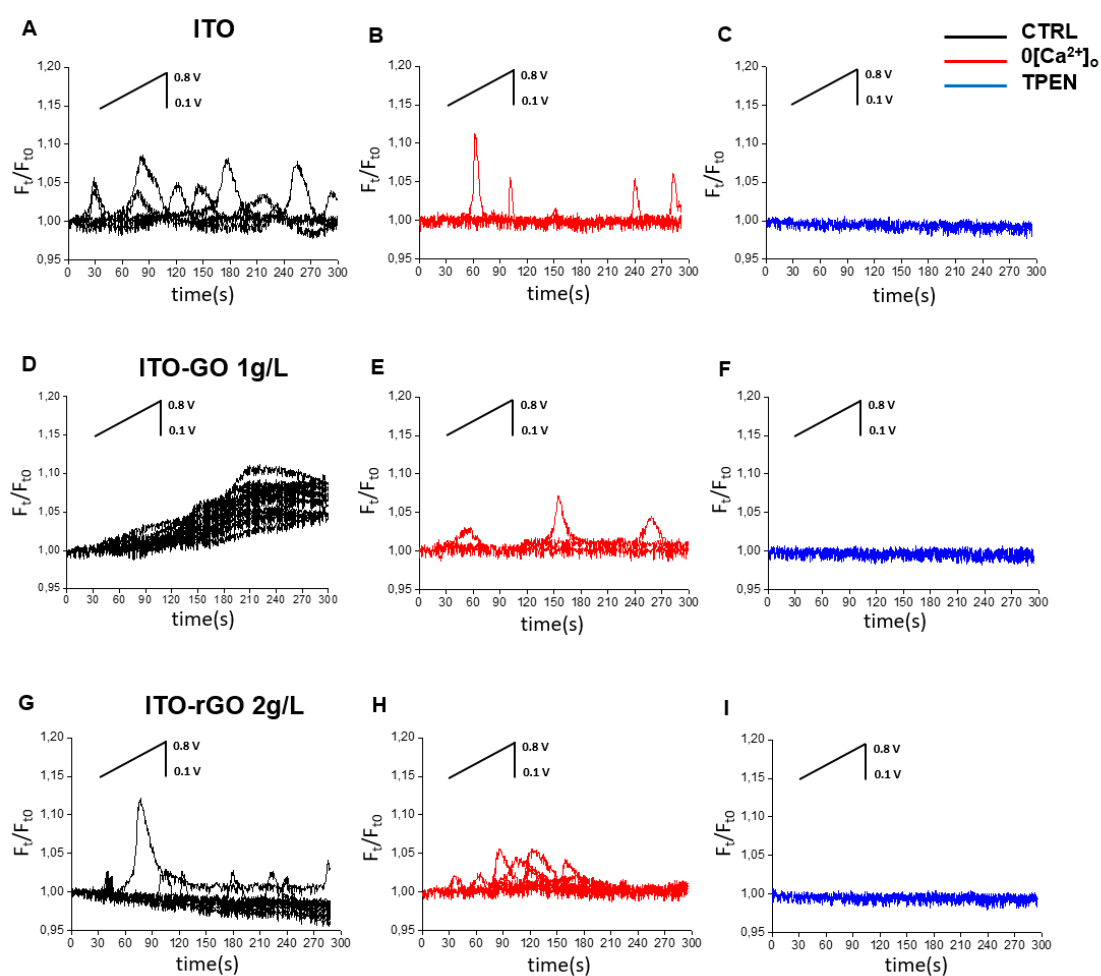


Figura R7 Analisi farmacologica della risposta di astrociti indotta dalla stimolazione elettrica. Tracce rappresentative degli esperimenti effettuati in condizioni di soluzione esterna standard (tracce nere, CTRL), soluzione esterna priva di calcio (tracce rosse, $0[Ca^{2+}]_o$) ed in presenza di TPEN, un chelante del calcio intracellulare (tracce blu, TPEN).

Per verificare il contributo dell'influsso di calcio extracellulare nell'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ l'esperimento è stato condotto esponendo le cellule a soluzione salina esterna priva di calcio. La rimozione di calcio extracellulare manteneva una risposta astrogliale di tipo oscillatorio su ITO e ITO-rGO, suggerendo il possibile rilascio di calcio dai depositi citoplasmatici, mentre oscillazioni di minore intensità risultavano in ITO-GO 1g/L, confermando il possibile ingresso di calcio nel citosol dal compartimento extracellulare.

Il contributo dell'efflusso di calcio intracellulare dai depositi citoplasmatici è stato verificato mediante l'aggiunta dell'inibitore TPEN, selettivo per i canali del calcio intracellulare. La presenza di TPEN aboliva completamente l'effetto dell'aumento di calcio indotto dall'elettrostimolazione, in ITO, ITO-GO 1g/L e ITO-rGO.

4.4 Dispositivi ITO-GO flessibili

L'ultimo passo del presente lavoro è stato indagare l'effetto della stimolazione elettrica in astrociti mediante dispositivi flessibili, basati su ITO-GO depositato su un substrato di polietilene tereftalato (PET) (figura R8A).

Lo studio della biocompatibilità conferma la vitalità di cellule astrogliali piastrate su PET-ITO e PET-ITO-GO, a 5 DIV (figura R8B, C).

Le tracce rappresentative della risposta astrogliale in Calcium imaging ottenute in PET-ITO (figura R8D) e PET-ITO-GO 2g/L (figura R8E) rivelano un comportamento sovrapponibile a quello riscontrato precedentemente in ITO e ITO-GO 2g/L depositato su substrato vetroso. Questo risultato suggerisce la possibilità di impiegare tali dispositivi come substrati flessibili per la crescita e la stimolazione elettrica di astrociti *in vivo*.

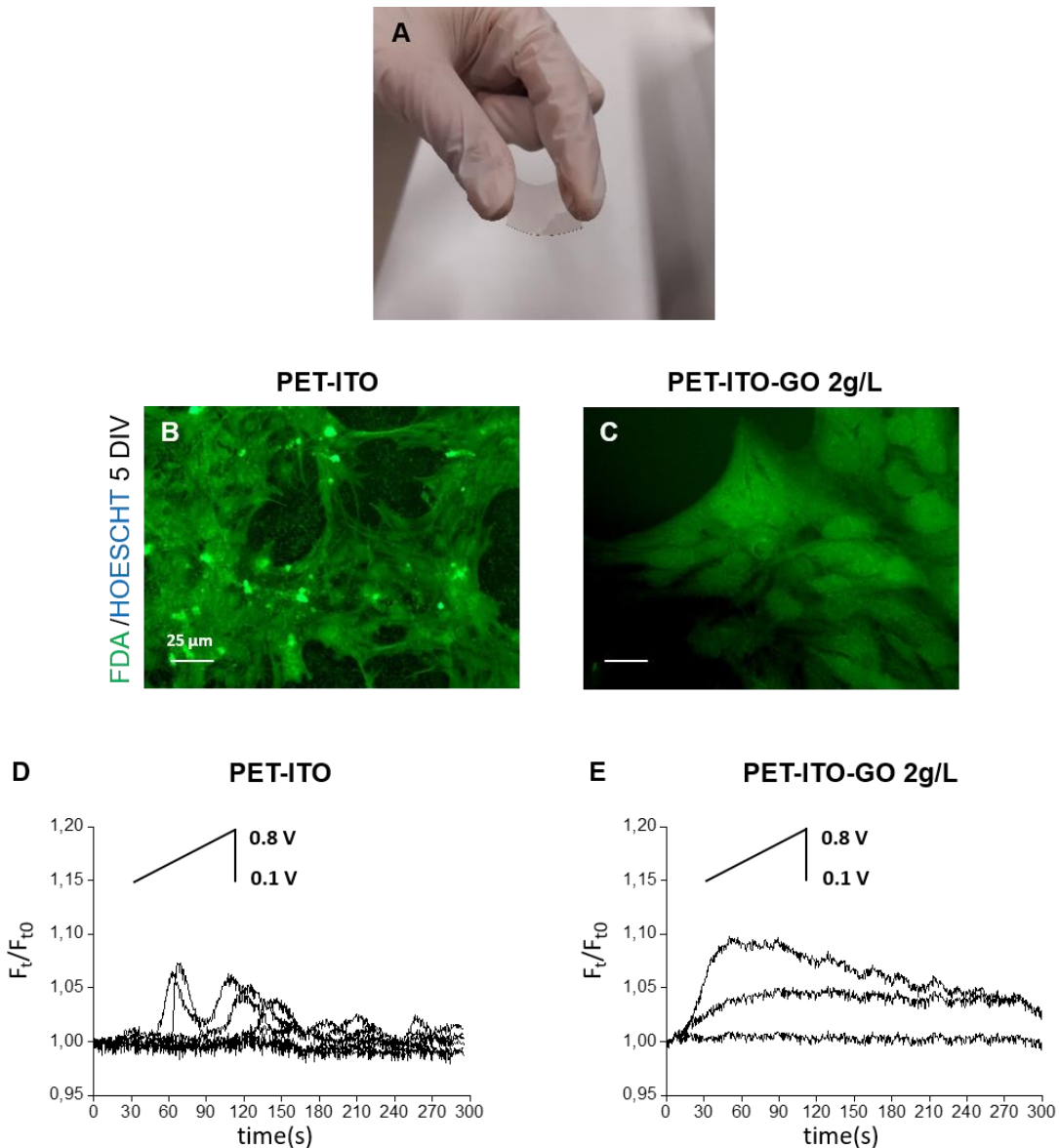


Figura R8 A) Substrato ITO-GO depositato su PET; B,C) Immagini a fluorescenza di astrociti sottoposti a saggio FDA, piastrati rispettivamente su PET-ITO e PET-ITO-GO 2g/L. D, E) Tracce rappresentative di Calcium imaging indicative della variazione di fluorescenza in astrociti piastrati rispettivamente su PET-ITO e PET-ITO-GO 2g/L.

4.5 Discussione

Il risultato principale del presente lavoro di tesi riguarda il dato a dimostrazione che la stimolazione elettrica mediante differenti dispositivi ITO-GO induce differenti risposte di calcio in astrociti. In particolare, l'applicazione dell'elettrostimolazione lenta innesca risposte astrogliali di tipo oscillatorio con rapide dinamiche temporali in ITO e ITO-rGO, tipiche dei fenomeni di rilascio di calcio da parte dei depositi citoplasmatici, mentre produce transienti più lenti in ITO-GO a differenti

concentrazioni e spessore, caratteristici dei fenomeni di influsso di calcio dall'esterno.

L'analisi statistica evidenzia come non solo la risposta fosse qualitativamente diversa ma anche quantitativamente.

In quest'ottica abbiamo formulato due diverse ipotesi: 1) i differenti dispositivi analizzati erano in grado di interagire diversamente con la cellula 2) i differenti dispositivi analizzati erano in grado di generare una diversa caduta di potenziale che veniva percepita diversamente dalla cellula e che quindi generava una risposta diversa.

I dati a sostegno della prima ipotesi sono ancora scarsi. Infatti, dall'analisi di biocompatibilità non si evidenzia una migliore adesione alle cellule cresciute su solo ITO rispetto alle cellule con ITO-GO o ITO-rGO. Pertanto, i dati preliminari tenderebbero a far escludere che il diverso effetto sia mediato da una diversa interazione cellula/materiale. Tuttavia, una analisi statistica più accurata sarà necessaria.

La spiegazione biofisica alla base dei diversi comportamenti potrebbe essere legata alla differente sensibilità degli astrociti a stimolazioni di tipo resistivo o capacitivo. La schematizzazione elettrica dell'interfaccia dispositivo-astrociti può essere descritta come una serie di capacitori e resistori, ai capi della quale si instaura una differenza di potenziale, che genera il passaggio di corrente attraverso il bagno cellulare. Le capacità e resistenze coinvolte sono quelle relative ai vari elementi del circuito: l'elettrodo di riferimento, la soluzione, l'ITO e il GO.

La caduta di potenziale totale misurata fra ITO (a potenziale maggiore) ed elettrodo di riferimento (a potenziale minore), è data dalla somma delle singole cadute di tensione su ciascuna interfaccia del sistema. Lo strato di ossido di grafene agisce come isolante, dove si ha la maggior parte della caduta di potenziale. Più è spesso lo strato di GO, maggiore è la resistenza e quindi maggiore è la caduta di potenziale a tale interfaccia.

Nel caso del rGO, lo strato di ossido di grafene presenta una bassa resistenza, mentre nel caso del GO 1g/L, GO 2 g/L e GO 2g/L X10 si ha una resistenza via via più elevata, con differenze di potenziale crescenti.

Più spesso è lo strato isolante di GO, più forte è il campo elettrico (essendo la derivata del potenziale): questo spiega il passaggio dal comportamento resistivo al comportamento capacitivo. Infatti mentre nel rGO l'effetto riscontrato è puramente dovuto al passaggio di corrente attraverso componenti resistivi, la presenza di uno strato di GO quanto più isolante induce l'accumulo di cariche negative all'interfaccia elettrodo di riferimento-cellula e di cariche positive all'interfaccia del GO, descrivendo un effetto di tipo capacitivo.

Pertanto la risposta oscillatoria di astrociti su ITO e ITO-rGO 2g/L sembra essere legata ad un comportamento prevalentemente resistivo. Al contrario, la risposta crescente lenta di astrociti su ITO-GO 1g/L, ITO-GO 2g/L, ITO-GO 2g/L X10 indica il prevalere della risposta astrogliale ad una componente capacitiva. In particolare l'effetto capacitivo cresce all'aumentare del numero di strati di ossido di grafene, e maggiori sono la concentrazione e lo spessore, più la dinamica temporale della risposta risulta veloce.

5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il lavoro riportato presenta per la prima volta un dispositivo basato su ossido di grafene in grado di modulare le funzionalità di cellule astrogliali non eccitabili, applicando un campo elettrico extracellulare.

In questo senso, i risultati ottenuti rivelano le potenzialità del grafene come interfaccia biocompatibile e flessibile per la crescita e il differenziamento di astrociti *in vitro*, con la possibilità di migliorarne la biocompatibilità tramite processi di funzionalizzazione dell'ossido di grafene.

Da approfondire saranno aspetti farmacologici e di manipolazione biologica che consentiranno di identificare i segnali molecolari che sottendono all'effetto osservato. In particolare è noto che gli astrociti *in vitro* ed *in vivo* esprimono canali del calcio appartenenti alla famiglia di canali Transient Receptor Potential. Questi canali sono canali cationici non selettivi permeabile a Ca^{2+} , Na^+ e K^+ . In particolare il canale TRPA1 è espresso in astrociti ed è implicato nel controllo dei livelli basali di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e regola il rilascio e l'assorbimento di neurotrasmettitori, come D-serina e GABA. D'altra parte il canale TRPV4 è sovraespresso negli astrociti a seguito di ischemia in un modello di ratto di occlusione aortica cerebrale media ed in pazienti affetti da forme di epilessia clinicamente intrattabile. Tutte queste evidenze evidenziano la rilevanza della nostra scoperta e la potenziale applicazione dell'uso della stimolazione con i dispositivi GO in neurofisiologia. Inoltre, la disfunzione di segnali di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ astrogliali dipendenti dal rilascio da compartimenti citoplasmatici si evidenzia come causale in forme di accumulo di cataboliti e di degenerazioni nervose progressive che si osservano nella Malattia di Alzheimer e Parkinson. Una letteratura molto recente evidenzia inoltre un ruolo critico dei segnali astrogliali di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nella mediazione dello stimolo sensoriale nocicettivo, acuto, cronico e neuropatico [Ji et al., 2019].

I risultati qui riportati mostrano come una micro-nanoarchitettura di “semplice” fabbricazione del sistema qui presentato e l'applicazione di tensioni relativamente basse rendono l'approccio proposto potenzialmente adatto per la realizzazione di

dispositivi volti alla stimolazione elettrica di astrociti. La capacità di evocare differenti risposte di calcio astrogliali mediante differenti dispositivi basati su ossido di grafene può aprire la strada allo sviluppo di interfacce biofunzionali integrate che alternano diverse tipologie di strati di grafene per la modulazione selettiva dei segnali astrogliali, dirette a distinti target biologici astrogliali sia molecolari che funzionali. È interessante notare come molti studi ormai sottolineino che la Transcranial Direct Stimulation coinvolga principalmente la risposta astrogliale e non solo quella neuronale [Salatino et al., 2017].

Gli aspetti qui riportati, che sono ancora del tutto inesplorati, associati alla possibilità qui dimostrata di avere dispositivi flessibili che abbiano le suddette caratteristiche, potrebbero essere una prospettiva attrattiva nell'ingegnerizzazione di dispositivi biomedici rivolti alla diagnosi e terapia delle disfunzioni cerebrali quali le suddette forme di epilessia, edema ed ictus, nonché malattia di Alzheimer e Parkinson. D'altra parte la scoperta che cellule cosiddette "non eccitabili" siano in grado di discriminare tra un campo resistivo ed uno capacitivo apre scenari interessanti anche nelle neuroscienze di base, sul ruolo di queste cellule nella funzionalità dei circuiti nervosi.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E., Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nat Rev Neurosci.*7(1): 41-53, 2006

Agulhon C., Petravicz J., McMullen A. B., Sweger E. J., Minton S. K., Taves S. R., Casper K. B., Fiacco T. A., McCarthy K. D., What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology?, *Neuron* 59 (6): 932-946, 2008

Akita T., Ohara M, Okada Y., Patch-Clamp Techniques: General Remarks, Okada Y. (eds) Patch Clamp Techniques, Springer Protocols Handbooks, Springer, Tokyo, 2012

Allen N. J., Lyons D. A., Glia as architects of central nervous system formation and function, *Science* 362: 181-185, 2018

Antognazza M., R., Di Paolo M., Ghezzi D., Mete M., Di Marco S., Maya-Vetencourt J. F., Maccarone R., Desii A., Di Fonzo F., Bramini M., Russo A., Laudato L., Donelli I., Cilli M., Freddi G., Pertile G., Lanzani G., Bisti S., Benfenati F., Characterization of a Polymer-Based, Fully Organic Prosthesis for Implantation into the Subretinal Space of the Rat, *Adv. Healthcare Mater.* 5: 2271-2282, 2016

Apollo N. V., Maturana I. M., Tong W., Nayagam, D. A. X., Shivdasani M. N., Foroughi J., Wallace G. G., Praver S., Ibbotson M. R., Garrett D. J., Soft, flexible freestanding neural stimulation and recording electrodes fabricated from reduced graphene oxide, *Adv. Funct. Mater.* 25: 3551-3559, 2015

Araque A., Martín E. D., Perea G., Arellano J. I., Buño W., Synaptically Released Acetylcholine Evokes Ca^{2+} Elevations in Astrocytes in Hippocampal Slices, *Journal of Neuroscience* 22 (7): 2443-2450, 2002

Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P., Haydon P. G., Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner, *Tins* 22(5), 1999

Araque A., Sanzgiri R. P., Parpura V., Haydon P. G., Calcium Elevation in Astrocytes Causes an NMDA Receptor- Dependent Increase in the Frequency of Miniature Synaptic Currents in Cultured Hippocampal Neurons, *The Journal of Neuroscience* 18(17): 6822-6829, 1998

Balandin A. A., Ghosh S., Bao W., Calizo I., Teweldebrhan D., Miao F., Lau C. N., Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene, *Nano Lett.*, 8(3): 902-907, 2008

Barres B. A., Chun L. L. Y., Corei D. P., Ion channels in vertebrate glia, *Annu. Rev. Neurosci.* 13:441-74, 1990

Bazargani N., Attwell D., Astrocyte calcium signaling: the third wave, *Nature Neuroscience* 19(2): 182-189, 2016

Benfenati V., Ferroni S., Water transport between CNS Compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels, *Neuroscience* 168: 926-940, 2010

Benfenati V., Martino N., Antognazza M. R., Pistone A., Toffanin S., Ferroni S., Lanzani G., Muccini M., Photostimulation of Whole-Cell Conductance in Primary Rat Neocortical Astrocytes Mediated by Organic Semiconducting Thin Films, *Adv. Healthcare Mater.* 3(3): 392-399, 2014

Benfenati V., Nicchia G. P., Svelto M., Rapisarda C., Frigeri A., Ferroni S., Functional down-regulation of volume-regulated anion channels in AQP4 knockdown cultured rat cortical astrocytes, *Journal of Neurochemistry*, 100: 87-104, 2007

Benfenati V., Toffanin S., Bonetti S., Turatti G., Pistone A., Chiappalone M., Sagnella A., Stefani A., Generali G., Ruani G., Saguatti D., Zamboni R., Muccini M., A transparent organic transistor structure for bidirectional stimulation and recording of primary neurons, *Nat Mater.* 12(7): 672-80, 2013

Bianco A., Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52(19), 4986-4997, 2013

Bootman M. D., Rietdorf K., Collins T., Walker S., Sanderson M., Ca²⁺-Sensitive Fluorescent Dyes and Intracellular Ca²⁺ Imaging, *Cold Spring Harb Protoc.* 2013(2): 83-99, 2013

Borrachero-Conejo A. I., Saracino E., Natali M., Prescimone F., Karges S., Bonetti S., Nicchia G. P., Formaggio F, Caprini M., Zamboni R., Mercuri F., Toffanin S., Muccini M., Benfenati V., Electrical Stimulation by an Organic Transistor Architecture Induces Calcium Signaling in Nonexcitable Brain Cells, *Adv. Healthcare Mater.* 8(3), e1801139, 2019

Bramini M., Alberini G., Colombo E., Chiacchiaretta M., DiFrancesco M. L., Maya-Vetencourt J. F., Maragliano L., Benfenati F., Cesca F., Interfacing Graphene-Based Materials With Neural Cells, *Frontiers in Systems Neuroscience* 12(12), 2018 12

Bramini M., Rocchi A., Benfenati F., Cesca F., Neuronal Cultures and Nanomaterials, M. Chiappalone et al. (eds.), Springer Nature Switzerland AG, *In Vitro Neuronal Networks, Advances in Neurobiology* 22: 51-79, 2019

Bramini M., Sacchetti S., Armirotti A., Rocchi A., Vázquez E., Castellano V. L., Bandiera T., Cesca F., Benfenati F., Graphene Oxide Nanosheets Disrupt Lipid Composition, Ca²⁺ Homeostasis, and Synaptic Transmission in Primary Cortical Neurons, *ACS Nano* 10(7), 7154-7171, 2016

Charles A. C., Merrill J. E., Dirksen E. R., Sanderson M. J., Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate, *Neuron* 6(6): 983-92, 1991

Chiacchiaretta M., Bramini M., Rocchi A., Armirotti A., Giordano E., Vázquez E., Bandiera T., Ferroni S., Cesca F., Benfenati F., Graphene Oxide Upregulates the Homeostatic Functions of Primary Astrocytes and Modulates Astrocyte-to-Neuron Communication, *Nano Lett.* 2018, 18(9), 5827-5838

Chvátal A., Anděrová M., Neprašová H., Prajerová I., Benešová J., Butenko O., Verkhratsky A., Pathological Potential of Astroglia, *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3): S101-S110, 2008

Cornell-Bell A. H., Finkbeiner S. M., Cooper M. S., Smith S. J., Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signalling, *Science* 247(4941): 470-3,1990

Di Benedetto B., Rupprecht R., Targeting glia cells: novel perspectives for the treatment of neuropsychiatric diseases, *Curr Neuropharmacol.* 11(2):171-85, 2013

Dossi E., Vasile F., Rouach N., Human astrocytes in the diseased brain, *Brain Research Bulletin* 136: 139-156, 2018

Durso M., Borrachero-Conejo A. I., Bettini C., Treossi E., Scida` A., Saracino E., Gazzano M., Christian M., Morandi V., Tuci G., Giambastiani G., Ottaviano L., Perrozzì F., V. Benfenati V., Melucci M., Palermo V., Biomimetic graphene for enhanced interaction with the external membrane of astrocytes, *J. Mater. Chem. B* 6: 5335-5342, 2018

Geim A. K., Graphene: Status and Prospects, *Science* 324(5934): 1530-1534, 2009

Geim A. K., Novoselov K. S., The rise of graphene, *Nature Materials* 6:183-191, 2007

Georgakilas V., Otyepka M, Bourlinos A. B., Chandra V., Kim N., Kemp K. C., Hobza P., Zboril R., Kim K. S., Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications, *Chem. Rev.*112(11):6156–6214, 2012

Ghezzi D., Antognazza M. R., Dal Maschio M., Lanzarini E., Benfenati F., Lanzani G., A hybrid bioorganic interface for neuronal photoactivation, *nature communications* 2(166), 2011

Ghezzi D., Antognazza M. R., Maccarone R., Bellani S, Lanzarini E., Martino N., Mete M., Pertile G., Bisti S., Lanzani G., Benfenati F., A polymer optoelectronic interface restores light sensitivity in blind rat retinas. *Nat Photonics* 7(5): 400-406, 2013

Goenka S., Sant V., Sant S., Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering, *Journal of Controlled Release* 173:75-88, 2014

Gurunathan S., Kim J. H., Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials, *Int J Nanomedicine* 11: 1927-1945, 2016

Halassa M. M., Fellin T., Haydon P. G., The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease, *Trends in Molecular Medicine* 13(2): 54-63, 2007

Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J. *Pflfigers Arch* 391:85-100, 1981

Hatsopoulos N. G., Donoghue J. P., *The Science of Neural Interface Systems*, *Annu. Rev. Neurosci.* 32:249-66, 2009

Ji R. R., Donnelly C. R., Nedergaard M., Astrocytes in chronic pain and itch, *Nature Reviews Neuroscience* 20: 667-685, 2019

Kandel E. R., Schwartz J. H., T. M. Jessell, *Principi di neuroscienze*, Casa editrice Ambrosiana, 2015, 4ed

Kanemaru K., Sekiya H., Xu M.,² Satoh K., Kitajima N., Yoshida K., Okubo Y., Sasaki T., Moritoh S., Hasuwa H., Mimura M., Horikawa K., Matsui K., Nagai T., Iino M., Tanaka K. F., *In Vivo Visualization of Subtle, Transient, and Local Activity of Astrocytes Using an Ultrasensitive Ca²⁺ Indicator*, *Cell Reports* 8(1): 311-318, 2014

Kang P., Wang M. C., Nam W. S., *Bioelectronics with two-dimensional materials*, *Microelectronic Engineering* 161:18-35, 2016

Keller J. M., Frega M., *Past, Present, and Future of Neuronal Models In Vitro*, Springer Nature Switzerland AG, M. Chiappalone et al. (eds.), *In Vitro Neuronal Networks*, *Advances in Neurobiology* 22: 3-17, 2019

Kettenmann H., Verkhratsky A., Glial Cells, *Neuroscience in the 21st Century* 547-578, 2013

Kim K. S., Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier, *Nat Rev Microbiol.* 6(8): 625-634, 2008

Kimelberg H. K., Nedergaard M., Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets, *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7(4): 338-353, 2010

Kostarelos K., Melissa V., Hebert C., Garrido J. A., Graphene in the Design and Engineering of Next-Generation Neural Interfaces, *Adv. Mater.* 29(42), 1700909, 2017

Krishnamoorthy K., Veerapandian M., Yun K., Kim S. J., The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation, *Carbon* 53: 38-49, 2013

Kuffler S. W., Potter D. D., Glia in the leech central nervous system: physiological properties and neuron-glia relationship, *Journal of Neurophysiology* 27(2): 290-320, 1964

Kuga N., Sasaki T., Takahara Y., Matsuki N., Ikegaya Y., Large Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo, *The Journal of Neuroscience*, 31(7): 2607-2614, 2011

Lee C., Wei X., Kysar J. W., Hone J., Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene, *Science* 321(5887): 385-8, 2008

Lee J. H., Park S. J., Choi J. W., Electrical Property of Graphene and Its Application to Electrochemical Biosensing, *Nanomaterials* 9(2), 297, 2019

Leybaert L., Sanderson M. J., Intercellular Ca²⁺ waves mechanisms and function, *Physiol Rev* 92: 1359-1392, 2012

Li D., Agulhon C., Schmidt E., Oheim M., Ropert N, New tools for investigating astrocyte to neuroncommunication, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 193, 2013

Magistretti P. J., Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling, *Am J Clin Nutr* 90(3):875S-80S, 2009

Masi E., Azzarello E., Mancuso S., Multielectrode Array: A New Approach to Plant Electrophysiology, A. G. Volkov (ed.), *Plant Electrophysiology*, 2012

Maya-Vetencourt J. F., Ghezzi D., Antognazza M. R., Colombo E., Mete M., Feyen P., Desii A., Buschiazzo A., Di Paolo M., Di Marco S., Ticconi F., Emionite L., Shmal D., Marini C., Donelli I., Freddi G., Maccarone R., Bisti S., Sambuceti G., Pertile G., Lanzani G., Benfenati F., A fully organic retinal prosthesis restores vision in a rat model of degenerative blindness, *Nat Mater.* 16(6): 681-689, 2017

McCarthy K. D., de Vellis J., Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue, *JCB* 85 (3): 890, 1980

Montgomery D. L., Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease, *Vet Pathol* 31:145-167, 1994

Nagelhus E. A., Mathiisen T. M., Ottersen O.P., Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1, *Neuroscience*;129(4):905-13, 2004

Navarrete M., Perea G., Maglio L., Pastor J., de Sola R. G., Araque A., Astrocyte Calcium Signal and Gliotransmission in Human Brain Tissue, *Cerebral Cortex*, 23:1240-1246, 2013

Nedergaard M., Ransom B., Goldman S. A., New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain, *Trends in Neurosciences* 26 (10), 2003

Neher E., Sakmann B., Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres *Nature* 260(5554): 799-802, 1976

Newman E. A., New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission, *Trends in Neurosci.* 26(10): 536-42, 2003

Novoselov K. S., Geim A. K, Morozov S. V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grigorieva I. V, Firsov A. A., Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films, *Science* 306(5696):666-9, 2004

Oberheim N. A., Wang X., Goldman S., Nedergaard M., Astrocytic complexity distinguishes the human brain, *Trends in Neurosciences* 29(10):547-53, 2006

Pannasch U., Rouach N., Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behaviour, *Trends Neurosci.* 36(7):405-17, 2013

Park D. W., Ness J. P., Brodnick S. K., Esquibel C., Novello J., Atry F., Baek D. H, Kim H., Bong J., Swanson K. I., Suminski A. J., Otto K. J., Pashaie R., Williams J. C., Ma Z., Electrical Neural Stimulation and Simultaneous in Vivo Monitoring with Transparent Graphene Electrode Arrays Implanted in GCaMP6f Mice, *ACS Nano* 12(1): 148-157, 2018

Parpura V., Basarsky T. A., Liu F., Jefrinija K., Jefrinija S., Haydon P.G., Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling, *Nature* 369(6483):744-7, 1994

Perlmutter J. S., Mink J. W., Deep Brain Stimulation, *Annu Rev Neurosci.* 29: 229-257, 2006

Picaud S., Sahel J. A., Retinal prostheses: Clinical results and future challenges, *C. R. Biologies* 337(3): 214-222, 2014

Qu Y., He F., Yu C., Liang X., Liang D., Ma L., Zhang Q., Lv J., Wu J., Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 90:764-780, 2018

Rauti R., Lozano N., León V., Scaini D., Musto M., Rago I., Severino F. P. U., Fabbro A., Casalis L., Vázquez E, Kostarelos K., Prato M., Ballerini L., Graphene Oxide Nanosheets Reshape Synaptic Function in Cultured Brain Networks, *ACS Nano* 10: 4459-4471, 2016

Reina G., González-Domínguez J. M., Criado A., Vázquez E., Bianco A., Prato M., Promises, facts and challenges for graphene in biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 46(15): 4400-4416, 2017

Rocha P. R. F., Medeiros M. C. R., Kintzel U., Vogt J., Araújo I. M., Mestre A. L. G., Mailänder V., Schlett P., Dröge M., Schneider L., Biscarini F., de Leeuw D. M., Gomes H. L., Extracellular electrical recording of pH-triggered bursts in C6 glioma cell populations, *Sci. Adv.* 2(12): e1600516, 2016

Salatino J. W., Ludwig K. A., Kozai T. D. Y., Purcell E. K., Glial responses to implanted electrodes in the brain, *Nat Biomed Eng.* 1(11): 862–877, 2017

Sanderson M. J., Smith I., Parker I., Bootman M. D., *Fluorescence Microscopy*, Cold Spring Harb Protoc. 10, 2014

Scemes E., Giaume C., Astrocyte Calcium Waves: What They Are and What They Do, *Glia* 54: 716-725, 2006

Seifert G., Schilling K., Steinhäuser C., Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective, *Nat Rev Neurosci* 7: 194-206, 2006

Shi M., Du F., Liu Y., Li L., Cai J., Zhang G. F., Xu X. F., Lin T., Cheng H. R., Liu X. D., Xiong L. Z., Zhao G., Glial cell-expressed mechanosensitive channel TRPV4 mediates infrasound-induced neuronal impairment, *Acta Neuropathol.* 126(5):725-39, 2013

Sofroniew M. V., Vinters H. V., Astrocytes: biology and pathology, *Acta Neuropathol* 119:7-35, 2010

Spelman F. A., Cochlear Electrode Arrays: Past, Present and Future, *Audiol Neurotol* 11:77-85, 2006

Srinivasan R., Huang B. S., Venugopal S., Johnston A. D., Chai H., Zeng H., Golshani P., Khakh B. S., Ca²⁺ signaling in astrocytes from *Ip3r2*^{-/-} mice in brain slices and during startle responses in vivo, *Nature Neuroscience* 18(5): 708-17, 2015

Stoller M. D., Park S., Zhu Y., An J., Ruoff R. S., Graphene-Based Ultracapacitors, *Nano Lett.* 8(10), 2008

Suvarnaphaet P., Pechprasarn S., Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review, *Sensors* 17(10), 2161, 2017

Thomas C. A., Jr., Springer P. A., Loeb G. E., Berwald-Netters Y., Okun L., A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells, *Experimental Cell Research* 74: 61-66, 1972

Verkhatsky A., Butt A., *Glial Neurobiology. A textbook*, Wiley, Chichester, 2007

Verkhatsky A., Nedergaard M., Physiology of Astroglia, *Physiol Rev* 98: 239-389, 2018

Verkhatsky A., Patching the glia reveals the functional organisation of the brain, *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 453(3): 411-420, 2006

Verkhatsky A., Reyes R. C, Parpura V., TRP Channels Coordinate Ion Signalling in Astroglia, *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 166: 1-22, 2014

Verkhatsky A., Rodríguez J. J., Parpura V., Calcium signalling in astroglia, *Molecular and Cellular Endocrinology* 353: 45-56, 2012

Volterra A., Liaudet N., Savtchouk I., Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci.* 15(5): 327-35, 2014

Wang X. Y., Narita A., Müllen K., Precision synthesis versus bulk-scale fabrication of graphenes, *Nature Reviews Chemistry*, 2(1): 0100, 2018

Weiss N. O., Zhou H., Liao L., Liu Y., Jiang S., Huang Y., Duan X., Graphene: An Emerging Electronic Material, *Adv. Mater.* 24(43): 5782–5825, 2012

Wortmann M., Dementia: a global health priority – highlights from an ADI and World Health Organization report, *Wortmann Alzheimer's Research & Therapy* 4:40, 2012

Yang Y., Asiri A. M., Tang Z., Du D., Lin Y., Graphene based materials for biomedical applications, *Materials Today* 16(10): 365-373, 2013

Yue L., Weiland J. D., Roska B., Humayun M. S., Retinal stimulation strategies to restore vision: Fundamentals and systems, *Progress in Retinal and Eye Research* 53: 21-47, 2016

Zuchero J. B., Barres B. A., Glia in mammalian development and disease, *Development* 142(22), 3805-3809, 2015

Zuidema J. M., Gilbert R. J., Gottipati M. K., Biomaterial Approaches to Modulate Reactive Astroglial Response, *Cells Tissues Organs* 205(5-6):372–395, 2018

<http://www.who.int/en/>

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato di tesi, ringrazio quanti hanno partecipato alla realizzazione del mio lavoro.

Ringrazio il Dott. Roberto Zamboni, direttore dell'Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ISOF-CNR, Bologna), la Dott.ssa Valentina Benfenati, relatore di questo lavoro di tesi, e la Dott.ssa Emanuela Saracino, correlatore della tesi.

Ringrazio i ricercatori che hanno contribuito, in particolare: il Dott. Vincenzo Palermo, il Dott. Emanuele Treossi, la Dott.ssa Alessandra Scidà, la Dott.ssa Manuela Melucci, il Dott. Cristian Bettini, il Dott. Alessandro Kovtun del ISOF-CNR.

Ringrazio inoltre il Dott. Marco Caprini del Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna.

Ringrazio le colleghe di tirocinio, Alessia e Diletta, con cui ho condiviso questo percorso.

Grazie, infine, alla mia famiglia.