

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI  
MESSINA

---

**Dynamic and signaling of  $\text{Ca}^{++}$   
in astrocytes: a fluorescence  
study**

Dipartimento di Scienze Matematiche e Informatiche,  
Scienze Fisiche e Scienze della Terra

---

Dottorato di Ricerca in Fisica Ciclo XXXV

S.S.D. FIS/01

Tesi di dottorato di: Dott.<sup>ssa</sup> Rosa Musotto

Tutor:

Prof. Ulderico Wanderlingh

Coordinatore:

Prof.<sup>ssa</sup> Vincenza Crupi

Cotutor:

Ing. Giovanni Pioggia

Ing. Maurizio De Pittà

---

AA 2021-2022



# Indice

<b>1</b>	<b>Struttura e funzioni del cervello</b>	<b>1</b>
1.1	Il cervello in cifre . . . . .	1
1.2	Le cellule eccitabili . . . . .	2
1.3	Il potenziale di membrana e l'impulso nervoso . . . . .	4
1.4	Le cellule gliali . . . . .	7
1.5	Modelli neuronali . . . . .	11
1.6	La sinapsi tripartita . . . . .	13
<b>2</b>	<b>Gli astrociti</b>	<b>15</b>
2.1	Storia degli astrociti . . . . .	15
2.2	Morfologia e struttura degli astrociti . . . . .	18
2.3	Gli astrociti nei disturni neurocerebrali . . . . .	22
2.4	Gli astrociti e le onde Calcio . . . . .	25
2.4.1	Velocità di propagazione delle onde calcio astrocitarie . . . . .	30
2.5	Onde calcio negli astrociti: modellazione fisica e numerica . . . . .	31
<b>3</b>	<b>Implementazione di modelli per la dinamica del <math>Ca^{2+}</math></b>	<b>35</b>
3.1	Implementazione del modello Li-Rinzel . . . . .	35

<b>4</b>	<b>Metodi sperimentali</b>	<b>41</b>
4.1	Le colture cellulari . . . . .	41
4.1.1	Il trattamento delle cellule . . . . .	42
4.2	L'imaging del Calcio . . . . .	43
4.3	Il sistema ottico . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Trattamento dei dati</b>	<b>53</b>
5.0.1	Determinazione della posizione delle ROI . . . . .	62
<b>6</b>	<b>Analisi</b>	<b>65</b>
6.1	analisi dei dati . . . . .	65
<b>7</b>	<b>Risultati e Conclusioni</b>	<b>75</b>
7.1	Risultati . . . . .	75
7.1.1	Astroцитi umani . . . . .	75
7.1.2	Astroцитi murini . . . . .	79
7.2	Conclusioni . . . . .	85
<b>A</b>	<b>Software Phyton</b>	<b>87</b>
<b>A</b>	<b>Gnuplot script</b>	<b>89</b>
	<b>Bibliography</b>	<b>94</b>



# Abstract

Nel presente elaborato vengono riportati gli esiti più significativi di uno studio volto a chiarire le dinamiche dei segnali astrocitari del  $Ca^{2+}$  congiuntamente ai meccanismi che ne determinano il comportamento nello spazio e nel tempo.

Più specificatamente l'impiego integrato della Microscopia a fluorescenza e di marcatori specifici hanno reso possibile la rilevazione dei cambiamenti relativi degli ioni  $Ca^{2+}$  intracellulari.

Al fine di analizzare l'intensità media del segnale di fluorescenza in seno alle sequenze di immagini acquisite, è stato impiegato il software *Imagej* con il quale sono state individuate le regioni di interesse (ROI) per ogni cellula.

Sono state quindi determinate le tracce corrispondenti alla variazione di  $Ca^{2+}$  per ogni astrocita e, grazie alla compilazione di script specificatamente approntati, ne sono stati caratterizzati i profili.

Infine, l'applicazione di modelli computazionali ha permesso di simulare il comportamento dinamico degli ioni  $Ca^{2+}$  intracellulari e di metterne a confronto le risposte in cellule astrogliali sane e patologiche.



# Introduzione

L'evoluzione del sistema nervoso è avvenuta attraverso la specializzazione e la divisione delle funzioni, con reti di cellule neurali composte da neuroni eccitabili elettricamente e da cellule gliali non eccitabili elettricamente. Le cellule gliali sono state considerate per lungo tempo cellule passive, con funzioni limitate al sostegno e al mantenimento dell'omeostasi del tessuto nervoso.

Studi fisiologici degli ultimi anni hanno cambiato radicalmente questa visione, suggerendo che le cellule gliali e in particolare gli astrociti, non solo svolgono un ruolo di supporto per la corretta funzione neuronale, ma sono anche impegnati in attività di comunicazione, tra loro e con i neuroni interagendo dinamicamente con le sinapsi attraverso l'assorbimento e il rilascio di neurotrasmettitori mediati dai recettori del signaling intracellulare di  $Ca^{2+}$  [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8].

E' ormai noto che il signaling del  $Ca^{2+}$  astrocitario è essenziale per il corretto funzionamento dell'attività neuronale e la disfunzione della dinamica degli astrociti è implicata nell'insorgenza di disturbi della sfera neurologica come l'Alzheimer, il Parkinson, l'ictus, l'epilessia [9][10] [11] [12] [13].

La modulazione del  $Ca^{2+}$  è il più importante fattore astrocitario in risposta alla stimolazione dell'attività sinaptica dei neuromodulatori diffusi nell'am-

biente extracellulare e degli stimoli chimici, meccanici e ottici esogeni. In questo quadro, il singolo transiente di  $Ca^{2+}$  astrocitario è considerato come un'integrazione dello stimolo scatenante [14] e quindi, a seconda del punto di vista, come una codifica o una decodifica dello stimolo [15] [16].

Diversi sono i modelli spazio-temporali dei contributi di  $Ca^{2+}$  registrati dagli astrociti in risposta alla stimolazione, ciascuno dei quali può essere portatore di una propria codifica. A diverse modalità di codifica potrebbero corrispondere diverse segnalazioni a valle, tra cui la gliotrasmissione e quindi la regolazione della funzione sinaptica. Il  $Ca^{2+}$  intracellulare è un secondo messaggero chiave nelle cellule viventi. Controlla vari processi fisiologici codificando le informazioni degli stimoli esterni attraverso l'ampiezza o la frequenza delle sue oscillazioni [17] [18]. La capacità degli astrociti di rilasciare gliotrasmettitori in seguito alle fluttuazioni di  $Ca^{2+}$  conferma che queste cellule partecipano attivamente all'elaborazione delle informazioni nel cervello [19]. Poiché gli astrociti non sono in grado di creare potenziali d'azione, rispondono all'attività neuronale aumentando il livello di calcio citosolico, scatenando una serie di reazioni che portano alla produzione di  $IP_3$  (inositolo 1, 4, 5-trifosfato) e al rilascio di gliotrasmettitori [20] diventando partner attivi nelle sinapsi.

Grazie allo sviluppo di nuove metodologie di imaging e all'uso di indicatori fluorescenti capaci di marcare in maniera specifica le componenti cellulari di interesse è stato possibile individuare le dinamiche spazio-temporali delle onde di  $Ca^{2+}$  negli astrociti.

In questo lavoro descriviamo le proprietà chiave dei segnali del  $Ca^{2+}$  astrocitario e i meccanismi spazio-temporali che permettono loro di diffondersi e interagire con i neuroni.

# Capitolo 1

## Struttura e funzioni del cervello

### 1.1 Il cervello in cifre

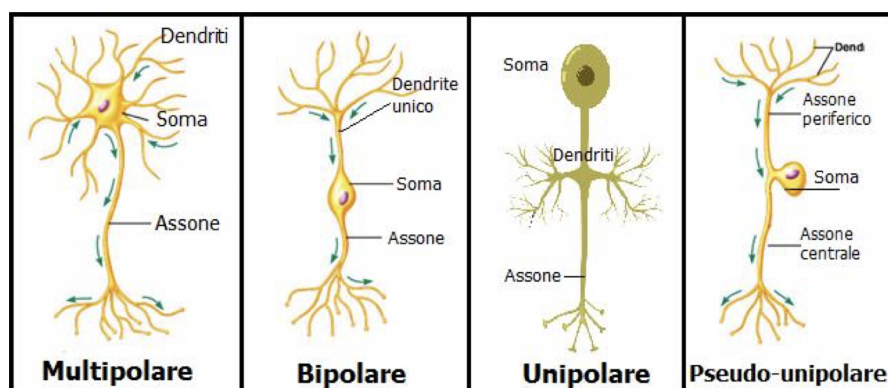
Il cervello umano, con un volume medio di  $1.250 \text{ cm}^3$  e con un peso medio di 1.400 g, pari a circa il 2 % del peso corporeo totale, ha una sorprendente capacità di elaborazione delle informazioni con una potenza di calcolo stimata tra  $10^{13}$  e  $10^{16}$  operazioni/sec. L'informazione funzionale del cervello umano, basata sul potenziale d'azione, è stimata in  $5.52 \times 10^{16}$  bit per secondo, con una potenza ricompresa tra 15 W e 25 W e una densità di potenza che va da  $1.1 \times 10^4 \text{ W/m}^3$  a  $1.8 \times 10^4 \text{ W/m}^3$  ad una temperatura operativa di  $37.3 \text{ }^\circ\text{C}$ . E' composto per il 75% da cellule cerebrali, per il 15% da sangue e per il 10% da liquido cerebrospinale. Si stima che un cervello umano medio contenga circa  $85.08 \pm 6.92$  miliardi di cellule localizzate nel cervelletto,  $77.18 \pm 7.72$  miliardi di cellule nella corteccia cerebrale (comprese la materia grigia e quella bianca) e  $8.42 \pm 1.50$  miliardi di cellule dislocate in altre regioni [21]. Pertanto, il cervelletto umano e la corteccia cerebrale contengono, insieme, la maggioranza (99,2%) dei neuroni cerebrali. Il cervello umano è caratteriz-

zato, nel suo complesso, da un rapporto tra cellule gliali e neuroni pari a 1:1 [22] ancorché esistano differenze significative tra i vari settori cerebrali. A titolo di esempio, la corteccia cerebrale, compresa la corteccia bianca sottocorticale, contiene il 72% di cellule gliali, pari a circa  $60.84 \pm 7.02$  miliardi, mentre il cervelletto ne contiene solo il 19%, pari a circa il  $16.04 \pm 2.17$  miliardi di cellule gliali; i gangli della base, il diencefalo e il tronco encefalico hanno un rapporto combinato di 11.35:1 cellule gliali/neuroni [21]. Inoltre, si stima che le sinapsi, che ammontano a  $2.42 \pm 0.29 \times 10^{14}$  in un cervello umano medio, elaborino collettivamente informazioni a velocità di spike di  $4.31 \pm 0.86 \times 10^{15}$  spikes/sec, consentendo al cervello umano di elaborare dati alla velocità di  $5.52 \pm 1.13 \times 10^{16}$  bit/sec.

## 1.2 Le cellule eccitabili

Il Sistema Nervoso Centrale (SNC) è costituito principalmente da due tipi di cellule: cellule eccitabili, ovvero i neuroni, e cellule non eccitabili, le cellule gliali. I neuroni svolgono un ruolo di vitale importanza all'interno del SNC occupandosi di integrare le informazioni che derivano dal Sistema Nervoso Periferico (SNP), stabilendo una eventuale risposta a livello degli organi. Essi possiedono un corpo cellulare detto *soma*, che costituisce il "centro di controllo", un nucleo, organelli che regolano l'attività cellulare e un ampio citoscheletro in comunicazione con i dendriti e l'assone. Il soma neuronale ha una bassa densità di canali  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e non è quindi in grado di condurre potenziali d'azione. I dendriti sono strutture molto sottili e ramificate che ricevono segnali in entrata da un recettore sensoriale o da un numero variabile di neuroni con i quali sono interconnessi attraverso terminazioni sinaptiche.

La funzione principale dei dendriti è quella di raccogliere i segnali sinaptici provenienti da uno o più neuroni presinaptici e di trasferirli alla regione di integrazione del neurone, il soma. I dendriti hanno un'alta densità di canali voltaggio-dipendenti. Gli assoni hanno origine dal monticolo assonico, che è una speciale regione somatica in cui sono espresse alte densità di canali  $Na^+$  e  $K^+$ . Il monticolo assonico è quindi l'area del neurone in cui si generano i potenziali d'azione. L'assone, invece, è la parte del neurone specializzata nella conduzione di segnali "tutto o niente" e dirige i segnali elettrici in uscita verso le cellule bersaglio. Nella sua parte finale, l'assone si ramifica in un numero variabile di terminazioni dove il segnale elettrico viene convertito in un segnale chimico, cioè viene rilasciato un neurotrasmettitore. I neuroni possono essere classificati in base alla loro struttura, o alla loro funzione, dal punto di vista strutturale si suddividono in: pseudounipolari, se assone e dendriti si uniscono creando un unico processo, bipolari, se invece possiedono un solo dendrite e un solo assone, multipolari, se sono privi di un assone principale identificabile.



**Figura 1.1:** Classificazione dei neuroni in base alla struttura. Tratto da *Fisiologia umana*, Silverthorn D.U., 2010.

In base alle loro funzioni, invece, vengono definiti come: *neuroni sensoriali*, che hanno il compito di condurre informazioni circa gli stimoli derivanti dai recettori sensoriali al SNC; *interneuroni*, che hanno il compito di trasmettere i segnali tra cellule; e *neuroni efferenti*, i quali, a loro volta, si suddividono in *neuroni autonomici*, se con i loro segnali si occupano di controllare la muscolatura liscia del miocardio; e *neuroni motori somatici*, se invece controllano la muscolatura scheletrica.

### 1.3 Il potenziale di membrana e l'impulso nervoso

I neuroni sono specializzati nella raccolta, conduzione e trasmissione di informazioni. La membrana plasmatica di un neurone è polarizzata, cioè presenta una differenza di carica elettrica tra l'interno e l'esterno della cellula. Tale differenza è dovuta alla concentrazione di ioni positivi (principalmente ioni sodio  $Na^+$ ) nello spazio extracellulare, rispetto agli ioni  $K^+$  presenti nello spazio intracellulare. Questa distribuzione asimmetrica produce una differenza di potenziale elettrico chiamata potenziale di riposo che viene mantenuto dall'azione della pompa sodio-potassio, capace di trasportare (attivamente) ioni  $Na^+$  dall'interno all'esterno della cellula e ioni  $K^+$  potassio dall'esterno all'interno di questa. Gli ioni  $K^+$  possono passare liberamente attraverso le proteine di membrana (chiamate proteine canale del potassio) e tendono a bilanciare la loro concentrazione, spostandosi dall'interno verso l'esterno. Il transito degli ioni attraverso la membrana è tuttavia fortemente influenzato dalla permeabilità della membrana cellulare agli ioni stessi. Per-



tanto, è stato definito che il gradiente di concentrazione e di permeabilità di membrana determinano il valore del potenziale di membrana che, a riposo, nei neuroni ha un valore pari a  $\sim -70$  mV.

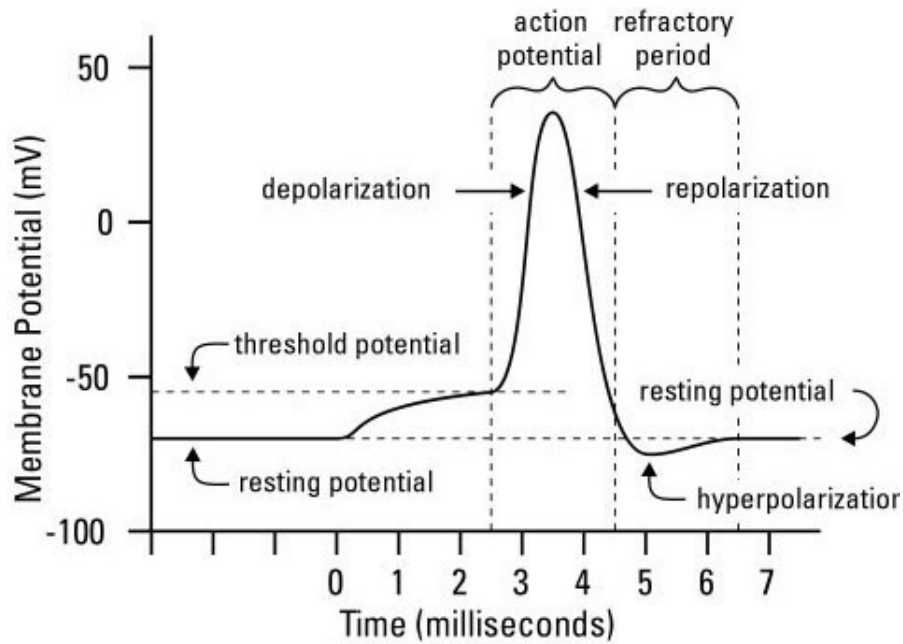


Figura 1.2: Potenziale d'azione vs tempo.

La rapida variazione della differenza di potenziale genera l'impulso nervoso, cui segue il ripristino delle condizioni normali. Infatti, se il neurone viene stimolato, a causa dell'apertura di alcuni canali del sodio, il potenziale di membrana può salire da  $\sim -70$  mV a  $\sim -50$  mV, raggiungendo il potenziale di soglia. Quando questo valore soglia viene raggiunto, molti canali del sodio si aprono e un gran numero di ioni  $Na^+$  passa dall'esterno all'interno della cellula. Quando la concentrazione di cariche positive all'interno della cellula aumenta, il potenziale si inverte bruscamente e raggiunge un valore di +35 mV, chiamato potenziale d'azione. Questa sequenza di eventi è

chiamata depolarizzazione della membrana. Pochi istanti dopo, le proteine del canale del sodio si richiudono, mentre quelle del canale del potassio, che nel frattempo si erano chiuse, si riaprono e, grazie all'azione della pompa sodio-potassio, vengono ripristinate le condizioni di riposo. Questo processo è chiamato ripolarizzazione della membrana. L'impulso nervoso viene trasmesso lungo la membrana degli assoni delle cellule nervose. Il potenziale d'azione è un fenomeno elettrochimico localizzato. Affinché si verifichi la trasmissione dell'impulso, la depolarizzazione deve essere trasmessa dall'area in cui si è verificata al tratto immediatamente adiacente. La propagazione dello stimolo avviene solo in una direzione, perché nel tratto interessato dal potenziale d'azione la pompa sodio-potassio lavora per ripristinare le condizioni di riposo. La concentrazione di ioni potassio nel liquido interstiziale all'esterno della cellula è, per un breve istante, più elevata rispetto alle normali condizioni di riposo; ciò provoca un'iperpolarizzazione della membrana che persiste fino al ripristino del valore di  $-70$  mV. Durante questo periodo, che dura circa 2 millisecondi, la membrana non può ricevere alcuno stimolo. Il periodo di refrattarietà impedisce la trasmissione della depolarizzazione nella stessa direzione da cui proviene, impedendo di fatto il blocco della trasmissione dell'impulso. Gli assoni delle cellule nervose umane sono avvolti da cellule di Schwann che formano la guaina mielinica isolante, interrotta dai cosiddetti nodi di Ranvier. L'impulso nervoso procede "saltando" da un nodo di Ranvier all'altro e avanza quindi molto più velocemente di quanto farebbe se percorresse l'intero assone. L'impulso nervoso viene trasferito da una cellula all'altra attraverso le sinapsi.

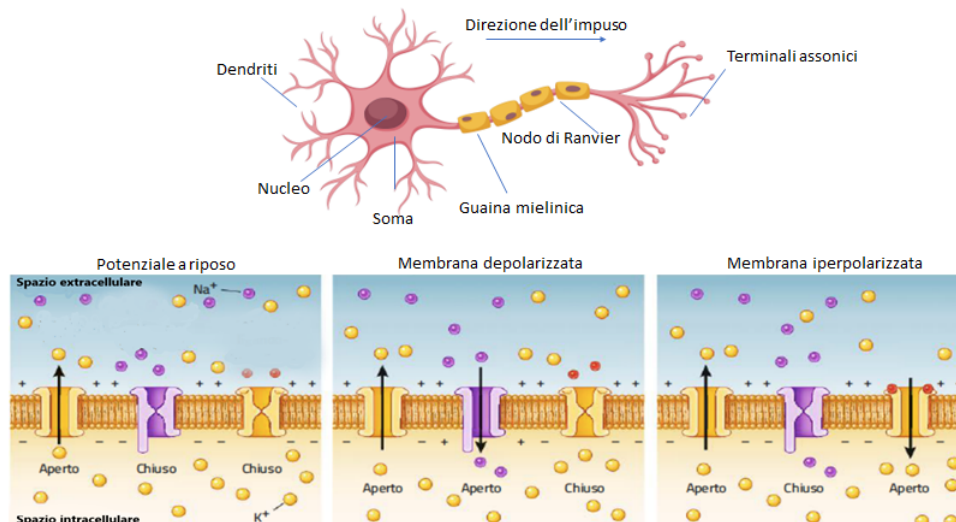


Figura 1.3: Schematizzazione di un astrocita (alto) e del potenziale di membrana (basso).

## 1.4 Le cellule gliali

Le cellule della glia, dette anche cellule gliali o neuroglia, sono cellule che, assieme ai neuroni, costituiscono il sistema nervoso. Le prime prove sperimentali risalgono al 1856 e portarono Rudolf Virchow ad annunciare l'esistenza di "...sostanza connettiva che forma nel cervello, nel midollo spinale e nei nervi sensoriali superiori una sorta di *Nerven Kitt* (*Neuroglia*), in cui sono incorporati gli elementi del sistema nervoso" [23].

Secondo Virchow, la glia non era altro che un tessuto connettivo composto da fibre e masse intercellulari, da cui il nome *Neuroglia*, che dal greco significa "*colla nervosa*".

La prima indagine approfondita sulla *Neuroglia* fu condotta da Camillo Gol-

gi che introdusse la prima grande teoria della funzione gliale, dimostrando infatti che il tessuto interstiziale gliale non era composto, come ritenevano alcuni autori, da una sostanza "amorfa", ma da cellule arrotondate o lenticolari o di forma stellare, comunque distinte dagli elementi più propriamente nervosi [24].



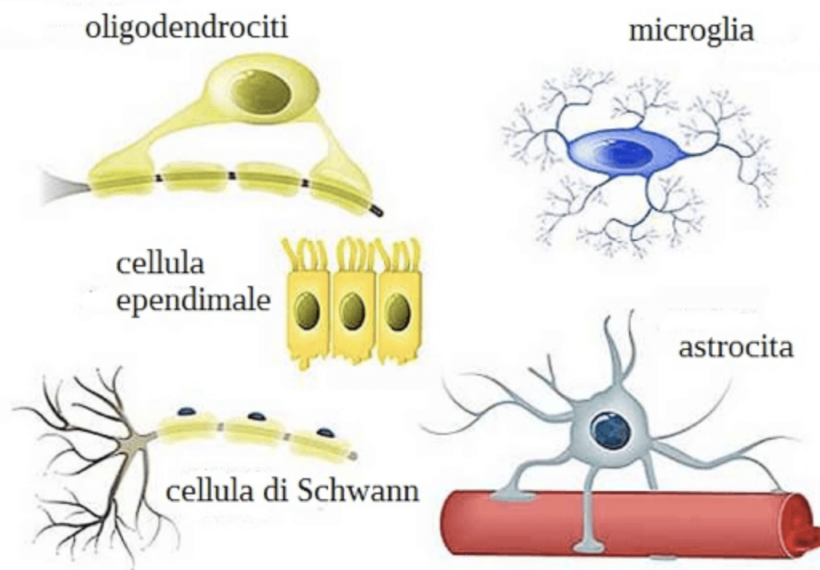
**Figura 1.4:** *Cellule neurogliali disegnate da Camillo Golgi [24]. Le cellule sono state colorate con la tecnica del cromato d'argento. I singoli astrociti a forma di stella formano una rete astrogliale e numerosi contatti con i capillari cerebrali.*

Il metodo di colorazione di Golgi era in grado di rivelare le singole cellule nervose nei minimi dettagli, Ramón Y Cajal, osservando gli stessi dati e utilizzando la stessa tecnica di colorazione inventata da Golgi, propose una nuova interpretazione della teoria dei neuroni. Quest'ultimo, geniale nel disegno e amante della fotografia, fu in grado di disegnare la complessa struttura del cervello nei minimi dettagli [25]. Tra le cose che riuscì a osservare con chiarezza e che lasciò sempre da parte, c'erano le cellule della Glia, che disegnò separatamente riempiendo pile di quaderni.



**Figura 1.5:** *Cellule gliali tratteggiate da Ramón Y Cajal.*

Oggi, a più di centocinquant'anni dalla loro descrizione iniziale, conosciamo diversi tipi di cellule gliali, distinguibili per la loro morfologia e le dimensioni del loro nucleo, per la loro origine embrionale e per le loro funzioni, che sono molto più complesse dell'azione di supporto meccanico proposta inizialmente. Nel sistema nervoso dei vertebrati, le cellule gliali sono classificate in macroglia, di origine neuroectodermica, e microglia, di origine mesodermica. Nel sistema nervoso centrale la macroglia comprende astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali. Queste ultime sono gli elementi cellulari che rivestono i ventricoli cerebrali e il canale midollare centrale, dove regolano la produzione, la circolazione e il riassorbimento del liquido cerebrospinale. Nel sistema nervoso periferico, la macroglia è rappresentata dalle cellule di Schwann, che corrispondono agli oligodendrociti centrali e sono responsabili della formazione delle guaine mieliniche degli assoni periferici, e dalle cellule satelliti, che rivestono la superficie esterna dei neuroni nei gangli spinali.



**Figura 1.6:** *Differenti tipologie di cellule gliali.*

Molte malattie del sistema nervoso possono essere ricondotte ad alterazioni o difetti nelle funzioni delle cellule gliali. Negli ultimi decenni, le evidenze emergenti riportano come il deficit della funzione gliale sembra essere coinvolto nei disturbi neurologici, come quelli della corteccia cerebrale, del mesencefalo e del midollo spinale, nelle atassie, nei disturbi dello sviluppo, nella sindrome autistica da deficit di attenzione e iperattività, nella schizofrenia, così come nei disturbi neuroendocrini e nei tumori pediatrici [26]

## 1.5 Modelli neuronali

Con una serie di articoli pubblicati negli anni Cinquanta, Hodgkin e Huxley [27] hanno aperto le porte a una comprensione dettagliata di come i segnali elettrofisiologici vengono trasmessi all'interno del sistema nervoso. Da questi lavori pionieristici è nata la descrizione del potenziale d'azione. Il modello di Hodgkin e Huxley esprime il comportamento elettrico di una cellula nervosa. Il primo passo della loro analisi è stato quello di dividere la corrente totale di membrana in corrente di capacità e corrente ionica:

$$I = C_M \frac{dV}{dt} + I_i \quad (1.1)$$

dove:

$I$  = densità di corrente totale di membrana (corrente positiva verso l'interno);

$I_i$  = densità di corrente ionica (corrente positiva verso l'interno);

$V$  = spostamento del potenziale di membrana dal suo valore di riposo (depolarizzazione negativa)

$C_M$  = capacità della membrana per unità di superficie (si presume costante);

$t$  = tempo.

Un'ulteriore suddivisione della corrente di membrana può essere fatta dividendo la corrente ionica in componenti trasportate da ioni sodio ( $I_{Na}$ ), ioni potassio ( $I_K$ ) e altri ioni ( $I_l$ ):

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_l \quad (1.2)$$

Le singole correnti ioniche espresse in termini di conduttanze ioniche ( $g_{Na}$ ,  $g_K$  e  $\bar{g}_l$ ) sono ottenute dalle relazioni:

$$I_{Na} = g_{Na}(E - E_{Na})I_K = g_k(E - E_K)I_l = \bar{g}_l(E - E_l)$$

dove  $E_{Na}$  e  $E_K$  sono i potenziali inversi di equilibrio per gli ioni sodio e potassio.  $E_l$  è il potenziale al quale la "corrente di dispersione" dovuta al cloruro e ad altri ioni è nulla. Per le applicazioni pratiche è conveniente scrivere queste equazioni nella forma:

$$\begin{aligned} I_{Na} &= g_{Na}(V - V_{Na}) \\ I_K &= g_k(V - V_K) \\ I_l &= \bar{g}_l(V - V_l) \end{aligned} \tag{1.3}$$

dove

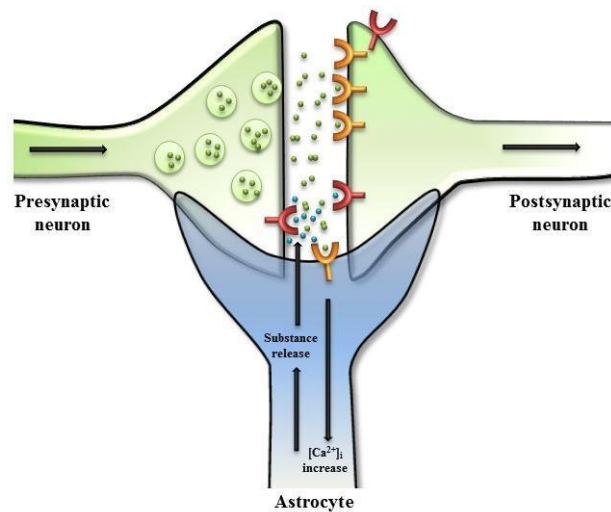
$$\begin{aligned} V &= E - E_r, \\ V_{Na} &= E_{Na} - E_r, \\ V_K &= E_K - E_r, \\ V_l &= E_l - E_r \end{aligned}$$

$E_r$  è il valore assoluto del potenziale di riposo.  $V_{Na}$ ,  $V_K$  e  $V_l$  possono essere misurati direttamente come spostamenti dal potenziale di riposo. Tuttavia il modello è estremamente costoso da implementare. Sono necessarie 120 operazioni in virgola mobile per valutare 0.1 ms di tempo del modello (assumendo che ogni esponente richieda solo dieci operazioni), quindi 1200 operazioni/ms. Pertanto, si può utilizzare il formalismo di Hodgkin-Huxley solo per simulare un piccolo numero di neuroni o quando il tempo di simulazione non è un problema.



## 1.6 La sinapsi tripartita

Studi recenti hanno dimostrato che le cellule gliali, e in particolar modo gli astrociti, partecipano attivamente alle sinapsi. Evidenze sperimentali mostrano l'esistenza di una comunicazione bidirezionale tra astrociti e neuroni evidenziando un nuovo concetto di sinapsi, la “sinapsi tripartita” che consiste di tre elementi funzionali: il neurone presinaptico, il neurone postsinaptico e l'astrocita [28] [29]. La comunicazione tra questi tre elementi ha caratteristiche molto complesse, che sembrano riflettere in modo più attendibile la complessità del trattamento delle informazioni tra gli elementi del SN. Entrambi i tipi di cellule ricevono input chimici che hanno un impatto sui loro recettori ionotropici e metabotropici e inviano segnali ai loro vicini attraverso il rilascio di trasmettitori chimici [14].



**Figura 1.7:** *Sinapsi tripartita: partecipano alla formazione della sinapsi tripartita un neurone presinaptico, un neurone postsinaptico e un astrocita.*

Tuttavia, sono stati realizzati esperimenti in vitro, che mostrano come

non tutte le sinapsi che si formano sono poste a stretto contatto con cellule gliali o sono in grado di rispondere ad uno stimolo da parte degli astrociti, portando a presumere che questa struttura tripartita non sia propria di tutti i tipi di sinapsi [28]. La comprensione degli eventi cellulari che regolano la sinapsi tripartita e il ruolo degli astrociti nella comunicazione tra neuroni e glia resta ancora un campo di studio aperto che potrebbe portare nel prossimo futuro alla scoperta di meccanismi molecolari utili alla comprensione e alla modulazione della trasmissione sinaptica [30].

# Capitolo 2

## Gli astrociti

### 2.1 Storia degli astrociti

Nel 1865, Otto Deiters produsse i primi disegni di cellule gliali stellate, che molto probabilmente erano astrociti.

L'analisi morfologica dettagliata delle cellule gliali iniziò con Camillo Golgi, che sviluppò la reazione di colorazione nera e produsse disegni di cellule gliali colorate a partire dal 1873 [24]. Golgi descrisse le cellule neurogliali stellate e scoprì che alcune cellule gliali (molto probabilmente astrociti protoplasmatici) inviano processi ai vasi sanguigni, dove stabiliscono le strutture delle estremità.

Poco tempo dopo, Santiago Ramón y Cajal, ricordando la sua prima osservazione del tessuto nervoso trattato con la "reazione nera" ideata qualche anno prima da Golgi, scrive *"Che spettacolo inaspettato! Filamenti neri sparsi, lisci e sottili, o cellule nere spinose, spesse, triangolari, stellate o fusiformi possono essere viste su uno sfondo giallo perfettamente traslucido! Si potrebbero quasi paragonare le immagini a disegni a inchiostro cinese su carta*

*giapponese trasparente*” [31]. Qualche anno dopo ideò la prima colorazione specifica per gli astrociti, con la tecnica del cloruro d’oro-sublimato, che, come sappiamo oggi, etichettava la proteina acida fibrillare gliale (GFAP). Con questa tecnica Cajal confermò l’origine degli astrociti dalla glia radiale e dimostrò anche che gli astrociti possono dividersi nel cervello adulto, gettando così le basi per le successive scoperte sulle proprietà staminali dell’astroglia. Il primo a coniare il termine astrocita fu Michael von Lenhossek di Wurzburg, nel suo articolo del 1893 scrive: *”Gli astrociti sono i piccoli elementi che costituiscono il sistema di sostegno del midollo spinale. Sono a forma di stella e nessun altro paragone descrive così chiaramente la loro forma”* [32]. Il ruolo attivo degli astrociti nel controllo del flusso di informazioni nel cervello fu suggerito da Carl Ludwig Schleich, che ipotizzò la trasmissione sinaptica da parte dei processi astrogliali [33].

Idee simili furono sostenute da Ramòn Y Cajal, il quale ritenne che la diminuzione dei processi astrogliali consentisse il flusso di informazioni durante lo stato di veglia, mentre la loro l’espansione bloccasse la connettività interneurale, inducendo così il sonno [34]. Cajal suggerì anche il ruolo centrale degli astrociti nel controllo della vascolarizzazione del cervello e nella mediazione dell’iperemia funzionale: contrazione/rilassamento dei processi perivascolari astrogliali che poteva aumentare o diminuire il diametro dei capillari cerebrali, regolando così il flusso sanguigno [34].

Fernando Castro, allievo di Cajal, propose in seguito che le cellule neurogliali potessero rilasciare sostanze neuroattive e partecipare direttamente alla trasmissione neurale [35].

Il primo a proporre che uno dei ruoli degli astrociti fosse quello di assorbi-

re e metabolizzare i neurotrasmettitori da quelle che lui chiamava "giunzioni neuronali", cioè le sinapsi, fu Ernesto Lugaro [36]. Tale ipotesi fu confermata sperimentalmente solo nel 1994 da Mennerick e Zorumski, il cui lavoro dimostrò che i trasportatori di glutammato negli astrociti sono responsabili di circa il 90% della ricaptazione di questa molecola dallo spazio extracellulare [37].

Le scoperte più importanti sugli astrociti furono fatte tra il 1950 e il 1970, con gli studi più approfonditi sulla fisiologia delle cellule gliali.

Walter Hild, nel 1958, con esperimenti di registrazione su microelettrodi, dimostrò che le proprietà elettrofisiologiche degli astrociti in coltura differivano da quelle dei neuroni [38].

Leif Hertz, invece, sottolineò il ruolo notevole della glia nell'assorbimento del  $K^+$  extracellulare rilasciato dai neuroni attivi [39].

Nel 1969 Milton Brightman e Tom Reese scoprirono per la prima volta le giunzioni gap [40].

Alla fine degli anni '80, Jean de Villis purificando le colture di cellule neurogliali, consentì un esame diretto della fisiologia degli astrociti a livello di singola cellula [41].

Nel 1984, il gruppo di ricerca di Kimelberg identificò i recettori del glutammato e del GABA sia negli astrociti che negli oligodendrociti [42].

Negli anni '90, gli astrociti assumono un ruolo di primo piano nella segnalazione neuronale ed è in questi anni che Ann Cornell-Bell scopre il metodo di comunicazione degli astrociti, ovvero la propagazione di onde di  $Ca^{2+}$  [43]; successivamente, nel 1994, Maiken Nedergaard, Philip Haydon e Vladimir Parpura trovano che gli astrociti possono stimolare l'aumento di  $Ca^{2+}$  nei

neuroni adiacenti [44], [45].

Robert Galambos è il primo a considerare la neuroglia come centrale per le funzioni cerebrali superiori, mentre ritiene che i neuroni siano cellule in grado di *"eseguire semplicemente le istruzioni date loro dalla glia"* [46].

Il tema della glia come elemento primario dell'elaborazione delle informazioni, della memoria, della cognizione e della coscienza riemerge regolarmente [47], [48],[49],[50]; questa ipotesi impegnativa manca solo di un supporto sperimentale credibile.

## 2.2 Morfologia e struttura degli astrociti

Fino a pochi anni fa, si pensava che gli astrociti fossero semplici cellule di supporto con caratteristiche simili in diverse aree cerebrali. Recenti scoperte hanno rivoluzionato il ruolo degli astrociti, che da cellule passive si è visto essere cellule polivalenti coinvolte in quasi tutti i processi del SNC, fungendo da unità di integrazione locale e da ponte tra comunicazione sinaptica e non sinaptica [1].

Come i neuroni, gli astrociti derivano embriologicamente dal neuroectoderma. Hanno caratteristiche morfologiche e funzionali distintive che si differenziano all'interno di aree specifiche del cervello. I progenitori degli astrociti migrano postnatalmente per raggiungere la propria area cerebrale e le relative proprietà. Svolgono un ruolo di regolazione delle funzioni cerebrali, sono coinvolti nella neurogenesi e nella sinaptogenesi, controllano la permeabilità della barriera emato-encefalica e hanno il compito di mantenere l'omeostasi extracellulare.

Partecipano attivamente alla formazione, all'efficienza e al mantenimento del-

le sinapsi grazie al rilasciano neurotrasmettitori e fattori trofici che aumentano la forza sinaptica, un meccanismo probabilmente coinvolto nei fenomeni di apprendimento e memoria.

Sono in grado di comunicare tra loro a grandi distanze formando una rete sinciziale [51], grazie alle loro estroflessioni chiamate gap-junctions. È stato calcolato che la superficie occupata da un astrocita è di circa  $66.000 \text{ m}^2$  e che un singolo astrocita può entrare in contatto con circa 140.000 sinapsi [52] [53].

I pedicelli astrocitari ricoprono anche i vasi sanguigni, contribuendo alla formazione della barriera ematoencefalica e al passaggio dei nutrienti dal sangue al cervello [54].

Gli astrociti esprimono sulla loro superficie un gran numero di canali ionici, citochine, fattori di crescita e neurotrasmettitori [55] [56] come, ad esempio, glutammato, D-serina e ATP, che possono modulare l'attività sinaptica e l'eccitabilità neuronale. Questo processo è oggi chiamato "*gliotrasmissione*" [57].

Attraverso un meccanismo noto come "*buffering spaziale*", gli astrociti sono in grado di catturare gli ioni in eccesso, in particolare gli ioni potassio ( $K^+$ ), che vengono rimossi dall'ambiente extracellulare grazie a canali selettivi e all'azione della pompa  $Na^+/K^+$  dove si accumulerebbero negli spazi intercellulari diventando tossici per i neuroni [58] [59] [60].

Un'altra importante funzione degli astrociti è quella di fungere da riserva di glucosio sotto forma di glicogeno [61]. Infine, gli astrociti svolgono un ruolo fondamentale nella protezione dei neuroni dallo stress ossidativo attraverso l'elevata produzione di molecole antiossidanti e di enzimi ad alta attività an-

tiossidante [62].

In base alle loro caratteristiche strutturali e funzionali gli astrociti si distinguono in: fibrosi, protoplasmatici e radiali.

- **Astrociti fibrosi**, presenti nella sostanza bianca del cervello, sono caratterizzati da una grande quantità di gliofibrille e da prolungamenti sottili e lunghi. Non presentano un'organizzazione a domini; sembrano essere ugualmente distinti l'uno dall'altro. Il loro ruolo è quello di fornire un supporto metabolico al tratto assonico, poiché la maggior parte di essi è in contatto con la vascolarizzazione. Data l'assenza di sinapsi nella materia bianca, gli astrociti fibrosi molto probabilmente non modulano l'attività neuronale [63].

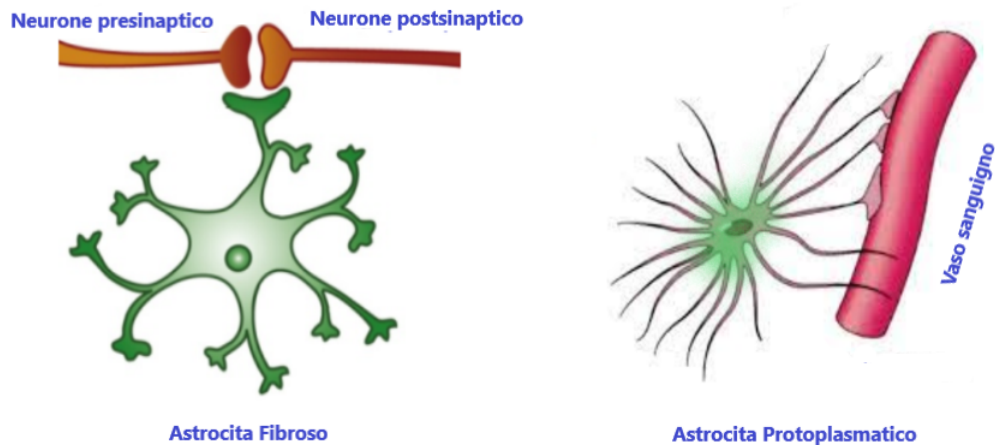
- **Astrociti protoplasmatici**, si trovano negli strati da II a VI della corteccia cerebrale, sono il tipo più abbondante nel cervello umano, così come nei cervelli di primati e ratti. La loro struttura risulta essere più complessa nel cervello umano rispetto alle cellule corrispondenti nel cervello di altri mammiferi. Sono caratterizzati dalla presenza di prolungamenti relativamente brevi e ramificati; quasi tutti gli astrociti protoplasmatici hanno le loro estremità a contatto con i vasi sanguigni. È stato stimato che un singolo astrocita protoplasmatico umano potrebbe fornire la copertura per un numero di sinapsi compreso tra 270.000 e 2 milioni [64] [65] [66].

- **Gli astrociti radiali** sono un tipo di astrociti temporanei che si formano durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale. In questa fase, gli astrociti radiali formano un complesso che si irradia dalla cavità ventricolare alla porzione più superficiale dell'encefalo. La rete formata da queste cellule funge da guida per i neuroni, permettendo loro di distribuirsi correttamente nello spazio cerebrale. Una volta completata l'architettura della rete neurale, gli



astrociti radiali si diversificano trasformandosi in astrociti fibrosi o protoplasmatici [67].

La prova intuitiva che le cellule gliali e gli astrociti in particolare potrebbero svolgere un ruolo particolarmente importante nella funzione cognitiva risiede nella correlazione tra il rapporto neuroni/glia del cervello e lo stato evolutivo della specie. Herculano-Houzel nel suo lavoro del 2014 fornisce un resoconto completo dei rapporti glia/neuroni nelle varie specie e del loro significato [68].



**Figura 2.1:** *Tipologie di astrociti in base alle caratteristiche strutturali e funzionali.*

Oltre alle classi anatomiche di astrociti presenti nell'uomo e nel topo, la corteccia dei primati contiene due classi di astrociti uniche: gli **astrociti delle proiezioni varicose** e gli **astrociti interlaminari**. Pertanto, i risultati degli studi sugli astrociti dei roditori, in particolare quelli sui modelli di malattia, potrebbero non essere generalizzabili agli astrociti umani. L'ac-

cesso al tessuto cerebrale umano è limitato a campioni di biopsia chirurgica ottenuti durante la resezione di tumori o di focolai epilettici. Se i dati ottenuti da questi campioni di tessuto derivati da pazienti, che di solito sono stati esposti a vari farmaci, catturino le proprietà fisiologiche degli astrociti nel cervello umano sano rimane una questione aperta [69] [70] [71].

Un approccio promettente per studiare la fisiologia di base degli astrociti umani è la riprogrammazione genetica diretta di cellule staminali embrionali umane o di cellule staminali pluripotenti indotte in astrociti [72].

Tuttavia, la funzionalità di questi astrociti deve essere ampiamente validata [73]. L'evoluzione verso paradigmi sperimentali sempre più avanzati in preparati intatti potrebbe intuitivamente essere la chiave per comprendere i principi fondamentali della segnalazione del  $Ca^{2+}$  da parte degli astrociti. Tuttavia, questi progressi vanno a scapito dei set di strumenti molto limitati per la manipolazione dei segnali del  $Ca^{2+}$  in questi preparati, rispetto a quelli disponibili per i set-up sperimentali più semplici. Pertanto, per decodificare completamente i meccanismi di segnalazione del  $Ca^{2+}$  negli astrociti è essenziale integrare i risultati ottenuti da diversi preparati.

## 2.3 Gli astrociti nei disturbi neurocerebrali

Sebbene le disfunzioni autonome degli astrociti non siano ancora state scoperte, è ormai assodato che svolgono un ruolo centrale nell'omeostasi fisiologica del SNC con un impatto su quasi tutte le funzioni attribuite ai neuroni. Sia in condizioni fisiologiche che nelle malattie, gli astrociti sono importanti per la sinaptogenesi, il rilascio di neurotrasmettitori, la cognizione, la neuroinfiammazione, l'immagazzinamento del glicogeno, la formazione

della barriera emato-encefalica (BBB), il rilascio di fattori di crescita trofici per i neuroni e altre cellule cerebrali e l'eliminazione di sostanze tossiche come l'eccesso di glutammato e il tamponamento spaziale del  $K^+$ .

Sono generalmente noti per il loro ruolo protettivo nei confronti dei neuroni in patologie come l'ictus, il trauma cranico e la lesione del midollo spinale; essi, infatti, rispondono a varie forme di lesione cerebrale attraverso cambiamenti potenziali come la morfologia, la capacità proliferativa e persino l'espressione genica contribuendo alla riparazione del tessuto post-traumatico e al rimodellamento sinaptico [74].

La risposta degli astrociti al trauma cranico, ad esempio, si riassume in perturbazioni indotte da una serie di processi, definiti collettivamente "*gliosi reattiva*", tra cui rimodellamento morfologico e proliferazione cellulare relativamente rapidi [75]. Una modellazione complessa ha suggerito che il post-rimodellamento morfologico astrocitario potrebbe ridurre l'incidenza dell'attività parossistica fornendo una migliore segregazione funzionale dell'input sinaptico da neuroni intatti rispetto a neuroni feriti [76]. Tuttavia, i processi biofisici alla base di questo rimodellamento rimangono non chiari. Le risposte degli astrociti alla perturbazione meccanica sono state studiate con un modello in vitro simulando una lesione da deformazione. il quadro emergente è che gli astrociti rispondono alla lesione da stiramento causata da aumenti di  $Ca^{2+}$  e rilascio di ATP. Entrambi questi due fattori hanno mostrato di essere positivamente correlati con ampiezza e frequenza delle deformazione [77] [78] [79].

Nel caso della schizofrenia, vari studi suggeriscono che, in vivo, gli astrociti potrebbero fornire "*eccitazione di fondo*" per mantenere le oscillazioni della

banda gamma. Inoltre, estendendo le conclusioni di Lee et al, si può speculare sul fatto che l'eziologia della schizofrenia possa essere attribuita, almeno in parte, a percorsi di signaling astrocitario disfunzionale [80].

E' interessante notare che l'analisi dei pazienti post-mortem con schizofrenia ha rilevato una ridotta espressione della proteina acida glaciale fluorescente (GFAP) nella corteccia prefrontale [81], in linea con le osservazioni di Lee et al.

Per quanto riguarda l'epilessia, le sue principali caratteristiche sono la presenza di convulsioni non provocate e la sincronizzazione neuronale locale anormale [82]. I risultati in letteratura forniscono prove evidenti che implicano il coinvolgimento degli astrociti nell'epilettogenesi. Poichè gli astrociti sono nella posizione ideale per modulare le proprietà della trasmissione sinaptica e dell'eccitabilità neuronale, è naturale aspettarsi che queste cellule non neuronali siano coinvolte, in una certa misura, nell'eziologia dell'epilessia. Nel corso degli anni si è accumulata una notevole quantità di prove, a dimostrazione del fatto che gli astrociti svolgono un ruolo critico nell'emergere di diverse forme di epilessia. Parpura e Haydon hanno dimostrato la modulazione astrocitaria dell'eccitabilità neuronale attraverso il rilascio di glutammato collegato agli aumenti fisiologicamente rilevanti di  $Ca^{2+}$  negli astrociti [83]. Basandosi in parte su questi risultati Nadkarni e Jung hanno ideato il primo modello computazionale di interazione astrocita-neurone e hanno predetto, sulla base dei loro risultati di modellazione, che gli astrociti potrebbero fare parte all'epilettogenesi [84]. Questa ipotesi è stata successivamente ampiamente affrontata in uno studio di modellazione computazionale da Silchenko e Tass [85]. Infine, in un modello in vitro di convulsioni focali

nella corteccia entorinale di ratto, la modulazione NMDA astrocitaria mediata da eccitabilità neuronale post-sinaptica ha migliorato le scariche ictali e questo coinvolgimento è stato mediato dal signaling astrocitario del  $Ca^{2+}$  [86].

I disturbi delle cellule astrocitarie sono, inoltre, correlati all'insorgenza di diverse malattie neurodegenerative e del neurosviluppo, come la malattia di Alzheimer e la malattia di Huntington per l'invecchiamento cerebrale, la sindrome di Rett e il ritardo mentale dell'X fragile per i disturbi del neurosviluppo. La neurodegenerazione può essere caratterizzata da uno stato infiammatorio attivo degli astrociti, solitamente descritto come un aumento della proteina gliale fibrillare acida (GFAP), che causa il rilascio nell'ambiente extracellulare di un'ampia varietà di molecole neuroprotettive o neurotossiche [75]. Inoltre, è stato accertato che in risposta agli insulti cerebrali la forma dei segnali di  $Ca^{2+}$  subisce un'enorme variazione nella sua dinamica spazio-temporale con aumenti di ampiezza, durata e frequenza in risposta al tessuto neuronale danneggiato. Pertanto, l'esplorazione dei segnali di  $Ca^{2+}$  astrocitario risulta essere un buon indicatore del fenotipo reattivo degli astrociti alle malattie e della gravità di alcune di queste [87] [88].

## 2.4 Gli astrociti e le onde Calcio

Gli ioni calcio svolgono un ruolo chiave in un'ampia varietà di attività cellulari, come la contrazione muscolare, la divisione cellulare, la secrezione, l'endocitosi, la fecondazione, il metabolismo, il movimento cellulare e la trasmissione sinaptica. La comprensione del ruolo degli ioni calcio nelle ri-

sposte cellulari è progredita notevolmente grazie allo sviluppo di marcatori che emettono luce in presenza di calcio libero.

Gli eventi di  $Ca^{2+}$  astrocitari possono essere classificati come spontanei o innescati. Gli eventi di  $Ca^{2+}$  spontanei sono generati intrinsecamente senza stimoli esterni, mentre gli eventi di  $Ca^{2+}$  innescati si verificano in risposta a cambiamenti nell'ambiente astrocitario, come l'attività sinaptica o neuronale e a stimoli interni ed esterni fisiologicamente rilevanti.

Studi recenti hanno dimostrato l'importanza delle onde di calcio intracellulari e intercellulari come elemento fondamentale nella comunicazione cellulare tra astrociti e tra astrociti e neuroni e che gli astrociti elettricamente silenziosi partecipano attivamente alle sinapsi formando "*sinapsi tripartite*" [45] [89] attraverso la modulazione del calcio.

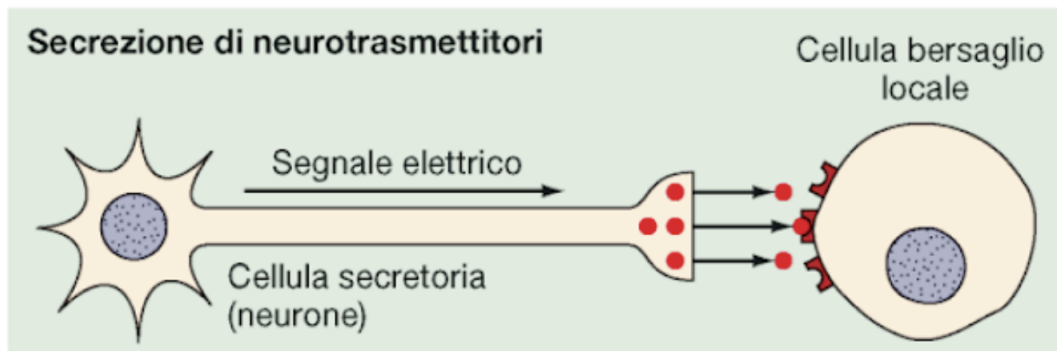
Il primo passo che ha portato all'ipotesi che gli astrociti potessero svolgere un ruolo primario nell'elaborazione delle informazioni nel SNC è stata la scoperta di canali ionici e recettori di membrana espressi in notevole varietà su queste cellule.

Gli astrociti sono in grado di rispondere alla stimolazione esterna dovuta all'attività neuronale con aumenti del calcio intracellulare e, soprattutto, sono in grado di trasmettere questi segnali di calcio agli astrociti adiacenti non stimolati, sotto forma di onde di  $Ca^{2+}$  (ICW) [43].

Per poter comprendere come si generano le ICW, è necessario innanzitutto definire e spiegare il ruolo degli organelli che partecipano a questo fenomeno. Esistono tre compartimenti intracellulari fondamentali per la trasmissione e la ricezione dei segnali di calcio: il Citoplasma, il Reticolo Endoplasmatico (ER) e i Mitocondri; il primo è delimitato dal plasmalemma mentre gli altri

due da endomembrane che presentano canali e trasportatori per lo ione calcio, le cui caratteristiche determinano l'impatto sulla forma dell'onda. Per quanto riguarda i mitocondri, sullo strato esterno della membrana vi è la presenza di canali anionici voltaggio-dipendenti che hanno una buona permeabilità allo ione calcio, mentre nello strato interno è presente un canale per il calcio molto selettivo solitamente indicato come  $Ca^{2+}$ -uniport.

Quando il neurone viene raggiunto da uno stimolo, le vescicole sinaptiche si fondono per esocitosi con la membrana pre-sinaptica, riversando il loro contenuto nello spazio sinaptico o fessura intersinaptica.



**Figura 2.2:** Schema di stimolo neuronale con rilascio di neurotrasmettitori

Il glutammato è di gran lunga il neurotrasmettitore più presente nel cervello ed è il principale agente della neurotrasmissione eccitatoria.

Recentemente, attraverso la microscopia elettronica, è stato dimostrato che gli astrociti possiedono recettori specifici per il glutammato sulla superficie esterna della membrana plasmatica.

Il legame del glutammato con il suo recettore di membrana dà inizio a una serie di reazioni: il recettore interagisce con la proteina G eterotrimerica, così chiamata perché composta da tre diverse subunità polipeptidiche denomina-

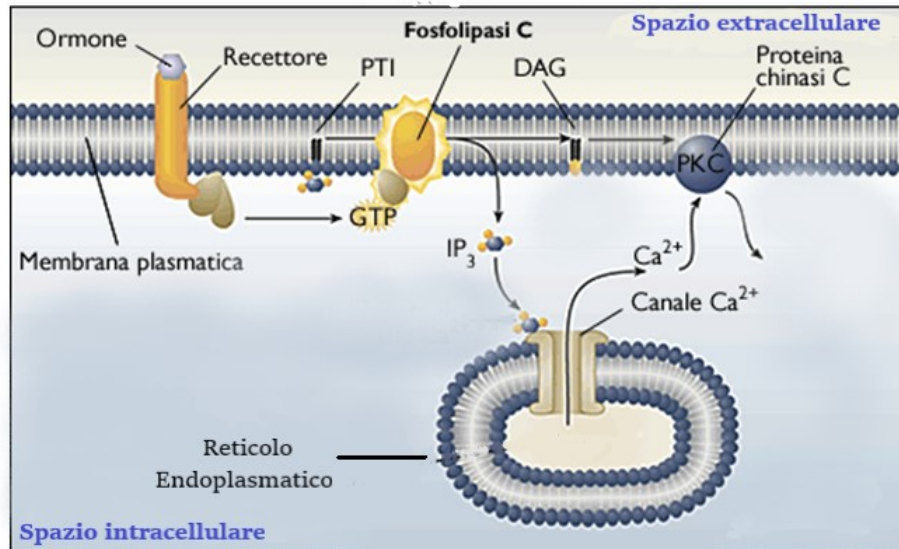
te  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  formando sulla superficie interna della membrana un complesso recettore-proteina G. L'interazione con il recettore induce un cambiamento conformazionale della subunità  $\alpha$  che provoca il rilascio del PIL ad essa legato e la sostituzione con GTP che, a sua volta, attiva la fosfolipasi C- $\beta$  fosfatidil-inositolo specifica (PI-PLC $\beta$ ). La PI-PLC $\beta$  è localizzata sulla superficie interna della membrana, legata all'interazione tra il suo dominio PH e una molecola di  $PIP_2$  immersa nel bilayer. L'enzima PI-PLC $\beta$  catalizza una reazione che scinde il  $PIP_2$  in due molecole, l'inositolo 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e il diaglicerolo (DAG). Le molecole di  $IP_3$  formate si diffondono nel citosol e si legano a un recettore specifico per  $IP_3$  situato sulla superficie dell'ER liscio.

Nelle cellule astrocitarie, il reticolo endoplasmatico è un sito di stoccaggio del calcio. Il recettore per  $IP_3$  è anche un canale tetramerico di  $Ca^{2+}$ .

Il legame con  $IP_3$  apre il canale, causando la diffusione di ioni  $Ca^{2+}$  nel citoplasma che, a sua volta, induce l'apertura dei recettori della rianodina nel RE, provocando il rilascio di  $Ca^{2+}$  nel citosol. Questo fenomeno è chiamato rilascio di calcio indotto dal calcio (CIRC). L'aumento dei livelli di calcio provoca un'onda di rilascio di calcio che si diffonde nell'intero compartimento citoplasmatico. L'aumento della concentrazione di ioni calcio è transitorio perché gli ioni vengono rapidamente pompati fuori dal citosol, nel reticolo endoplasmatico e/o nello spazio extracellulare.

Una volta terminata la sua funzione, l' $IP_3$  viene rapidamente de-fosforilato a inositolo e, alla fine del ciclo, reinserito nella membrana. Il calcio, invece, viene rapidamente eliminato dal citoplasma dalle pompe  $Ca^{2+}$ -ATPasi presenti nella membrana plasmatica e nel reticolo endoplasmatico.





**Figura 2.3:** Schema del fenomeno di rilascio di Calcio indotto da Calcio

Gli astrociti percepiscono molti tipi di segnali, incluso il rilascio volumetrico di neuromodulatori e cambiamenti nelle pressioni parziali di  $CO_2$  e  $O_2$ , pH, temperatura e pressione di perfusione cerebrale, e spesso rispondono a questi cambiamenti modulando i segnali  $Ca^{2+}$ . Come risultato dei meccanismi di segnalazione intracellulare condivisi che coinvolgono  $Ca^{2+}$  citosolico,  $IP-3$  e  $IP-3R$ , i transienti di  $Ca^{2+}$  generati spontaneamente così come la loro modulazione da parte dell'attività del recettore e l'induzione dipendente dal recettore di nuovi transienti di  $Ca^{2+}$  sono strettamente interconnessi. Ogni impostazione sperimentale fornisce un'istantanea di questo continuum, ma la sua composizione specifica dipenderà da molti parametri, tra cui l'attività

neuronale e neuromodulatoria e lo stato metabolico.

### 2.4.1 Velocità di propagazione delle onde calcio astro-citarie

Il signaling del  $Ca^{2+}$  è considerato troppo lento per essere coinvolto nelle elaborazioni delle informazioni in tempo reale nel cervello. Si stima, infatti, che un singolo potenziale d'azione neuronale abbia una durata di pochi millisecondi, i potenziali postsinaptici decine di millisecondi, mentre gli eventi di  $Ca^{2+}$  astrocitari hanno durata da diverse centinaia di millisecondi a pochi secondi.

L'intervallo medio tra la stimolazione sensoriale e l'insorgenza di un evento di  $Ca^{2+}$  astrocitario è molto variabile con un range che va da 1,0 s fino a 5,5 s [90]. Tuttavia, un piccolo sottoinsieme ( $\sim 8\%$ ) di eventi di  $Ca^{2+}$  astrocitari sono eventi "*veloci*", che hanno un tempo medio di insorgenza di  $\sim 333$  ms, confrontabile con alcuni neuroni (tempo medio di insorgenza neuronale  $\sim 208$  ms) [91].

Un microdominio di astrociti durante l'attività basale sviluppa in media 0,5-1,0 spikes di  $Ca^{2+}$  al minuto e questo valore può arrivare fino a 5-10 spikes di  $Ca^{2+}$  al minuto durante la stimolazione [92] [93]. Pertanto, un singolo astrocita può percepire una vasta gamma di segnali neuronali e integrare queste informazioni per derivare una risposta appropriata che può essere simultaneamente "*veloce*" e "*lenta*" in posizioni distinte della cellula.

Gli eventi di  $Ca^{2+}$  astrocitari potrebbero, quindi, sembrare troppo lenti rispetto agli eventi neuronali più veloci e la codifica delle informazioni astrocitarie basata sulla frequenza risultare inadeguata. Tuttavia, i dati di imaging

mostrano che i modelli di attività del  $Ca^{2+}$  astrocitario, ovvero l'area totale e il numero e la durata degli eventi di  $Ca^{2+}$ , cambiano in ogni fotogramma di imaging e in un dato momento; mentre alcuni eventi di  $Ca^{2+}$  iniziano, altri terminano. Di conseguenza, i modelli spaziali dell'attività astrocitaria possono cambiare quasi istantaneamente consentendo ai segnali di  $Ca^{2+}$  di propagarsi attraverso la rete.

## 2.5 Onde calcio negli astrociti: modellazione fisica e numerica

La scoperta che gli astrociti fanno capo all'attività neuronale [94] ha portato alla realizzazione di svariati modelli matematici e computazionali per la simulazione della dinamica astrocitaria. Tra questi particolare rilevanza occupano quelli relativi alla modulazione delle onde  $Ca^{2+}$  a causa della loro importanza nella comunicazione cellulare.

L'analisi del signaling del  $Ca^{2+}$  è complicata dalla sua natura stocastica e dalla dinamica spazio-temporale. Tra i modelli pionieristici per il signaling del  $Ca^{2+}$  il modello di Goldbeter [95] prevede il verificarsi di picchi periodici dello ione in assenza di oscillazioni di  $IP_3$ , indicando che i picchi ripetitivi di  $Ca^{2+}$  non richiedono necessariamente una concomitante variazione periodica di  $IP_3$  e possono essere indotti da una stimolazione esterna. Questo modello contiene solo due variabili: la concentrazione di  $Ca^{2+}$  libero nel citosol e la concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel reticolo endoplasmatico.

Successivamente, il modello De Young-Keizer [96] ha studiato le proprietà del canale  $IP_3$  recettore/ $Ca^{2+}$ . Le costanti di velocità nelle equazioni sono

state adattate ai dati cinetici e di equilibrio e il modello ha riprodotto con successo una serie di esperimenti in vivo e in vitro [97] [98] [99] [100]. Il modello incorpora un meccanismo di feedback positivo di  $Ca^{2+}$  sulla produzione di  $IP_3$  da parte della fosfolipasi-C (PLC). Si è notato che questo arricchisce le proprietà delle oscillazioni e porta a oscillazioni di  $Ca^{2+}$  accompagnate da oscillazioni di  $IP_3$ .

Nel 1994 Li e Rinzel [101] hanno creato un modello che riduce il modello De Young-Keizer a nove variabili a un sistema a due variabili. Le variabili rappresentano: la concentrazione citosolica di  $Ca^{2+}$  e la percentuale di recettori  $IP_3$  inattivati. Questo risultato è stato ottenuto utilizzando il metodo delle scale multiple per risolvere le equazioni del modello di De Young-Keizer su una successione di scale temporali più veloci per ridurlo a un sistema 2D. Il sistema ridotto ha una forma simile alle equazioni di Hodgkin-Huxley per l'eccitabilità elettrica dei neuroni e delle membrane plasmatiche [102].

Le due variabili dinamiche del modello LR sono solo la concentrazione di  $Ca^{2+}$  citosolico libero,  $C$  e la frazione di subunità aperte del recettore dell' $IP_3$   $h$ .

Con l'ipotesi che il legame di  $IP_3$  non sia correlato all'occupazione di  $Ca^{2+}$  nel sito di inattivazione, Li e Rinzel ottengono un modello "minimo" che mantiene la capacità di riprodurre le osservazioni sperimentali:

$$\frac{dC}{dt} = J_{chan}(C, I) + J_{leak} - J_{pump}(C) \quad (2.1)$$

e

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h} \quad (2.2)$$

Il modello di Li e Rinzel per la dinamica di  $Ca^{2+}$  è stato il punto di partenza per la maggior parte dei modelli per singoli astrociti [103] [15] [104] [105] [106] [107]. D'altra parte, alcuni modelli [108] [109] [110] hanno utilizzato il modello astrocitario di Höfer et al. come punto di partenza.

Il modello di Höfer [111] si basa sul modello sviluppato da Atri et al. [112], che esalta le oscillazioni del  $Ca^{2+}$  citosolico libero e si basa sul rilascio di  $Ca^{2+}$  attraverso il recettore/canale  $IP_3$ . Tenendo conto delle evidenze sperimentali, il modello racchiude il fatto che il  $Ca^{2+}$  citosolico libero modula i recettori  $IP_3$  in modo bifasico, il rilascio di  $Ca^{2+}$  è inibito da basse e alte concentrazioni di  $Ca^{2+}$  e facilitato da concentrazioni intermedie di  $Ca^{2+}$  e l'inattivazione del canale avviene su una scala più lenta rispetto all'attivazione. Il modello produce oscillazioni di  $Ca^{2+}$  per valori costanti di concentrazione di  $IP_3$  e riproduce una serie di esperimenti cruciali [113] [114] [115] [116][117]. Il modello riproduce onde circolari, planari e a spirale di  $Ca^{2+}$ :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_C \nabla_C^2 + J_{channel} - J_{pump} + J_{leak} \quad (2.3)$$

e

$$\tau_h \frac{dh}{dt} = \frac{K_2^2}{K_2^2 + C^2} - h \quad (2.4)$$

Come il modello di Li e Rinzel, anche il modello di Atri è un modello di gating.

È stato dimostrato sperimentalmente che, in risposta a stimoli esterni, i segnali di  $Ca^{2+}$  codificano informazioni sia attraverso la modulazione di frequenza (FM) [118] sia attraverso la modulazione di ampiezza (AM) [119]. Il modello di De Pittà et al. [15] conferma che la codifica dell'informazione

può avvenire attraverso la modulazione AM, FM o entrambe le modulazioni delle oscillazioni di  $Ca^{2+}$ . Il modello parte dal noto modello Li-Rinzel a due variabili  $Ca^{2+}$  intracellulare e recettori  $IP_3$  inattivi per il rilascio di calcio indotto e aggiunge una terza variabile: la regolazione della produzione e della fosforilazione di  $IP_3$ . Questo modello, denominato ChI, è stato poi esteso al modello G-ChI, che include la regolazione della produzione di  $IP_3$  da parte di segnali esterni di glutammato.

## Capitolo 3

# Implementazione di modelli per la dinamica del $Ca^{2+}$

### 3.1 Implementazione del modello Li-Rinzel

Per modellizzare la dinamica del  $Ca^{2+}$  astrocitario è stato implementato il modello Li-Rinzel a due variabili [101]. Le due variabili dinamiche del modello sono: la concentrazione di  $Ca^{2+}$  libero citosolico  $C$

$$\frac{dC}{dt} = J_{chan}(C, I) + J_{leak} - J_{pump}(C) \quad (3.1)$$

e la frazione delle subunità aperte del recettore dell'inosotolo trifosfato  $h$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h} \quad (3.2)$$

La dinamica di  $C$  è controllata da tre flussi:

$J_{chan}$  un rilascio di  $Ca^{2+}$ , controllato reciprocamente dal  $Ca^{2+}$  e dalla concentrazione di  $IP_3$ .

$J_{leak}$  una perdita passiva di  $Ca^{2+}$  dal reticolo endoplasmatico (RE) al citosol.

$J_{pump}$  un assorbimento attivo di  $Ca^{2+}$  nel RE dovuto all'azione delle pompe.

$$J_{chan}(C) = \Omega_c m_\infty^3 n_\infty^3 h^3 [C_T - (1 + \rho_A)C]$$

$$J_{leak}(C) = \Omega_L [C_T - (1 + \rho_A)C]$$

$$J_{pump}(C) = \frac{O_p C^2}{K_p^2 + C}$$

Insieme alle variabili di regolazione:

$$m_\infty = \frac{I}{I + d_1} \quad n_\infty = \frac{C}{C + d_5} \quad h_\infty = \frac{Q_2}{Q_2 + C}$$

$$\tau_h = \frac{1}{a_2(Q_2 + C)} \quad Q_2 = \frac{I + d_1}{I + d_3} d_2$$



di cui:

$\Omega_L$  tasso di perdita del  $Ca^{2+}$

$C_T$  concentrazione di  $Ca^{2+}$  libero nel RE

$\rho_A$  rapporto tra il volume del RE e il citoplasma

$O_p$  tasso di assorbimento massimo di  $Ca^{2+}$

$K_p$  affinità della pompa SERCA per il  $Ca^{2+}$

$\Omega_C$  tasso di rilascio massimo da parte di  $IP_3$

$a_2$  tasso di legame di  $IP_3$  per l'inibizione del  $Ca^{2+}$

$d_1$  affinità di legame di  $IP_3$

$d_3$  affinità di legame di  $IP_3$  quando  $Ca^{2+}$  è inattivo

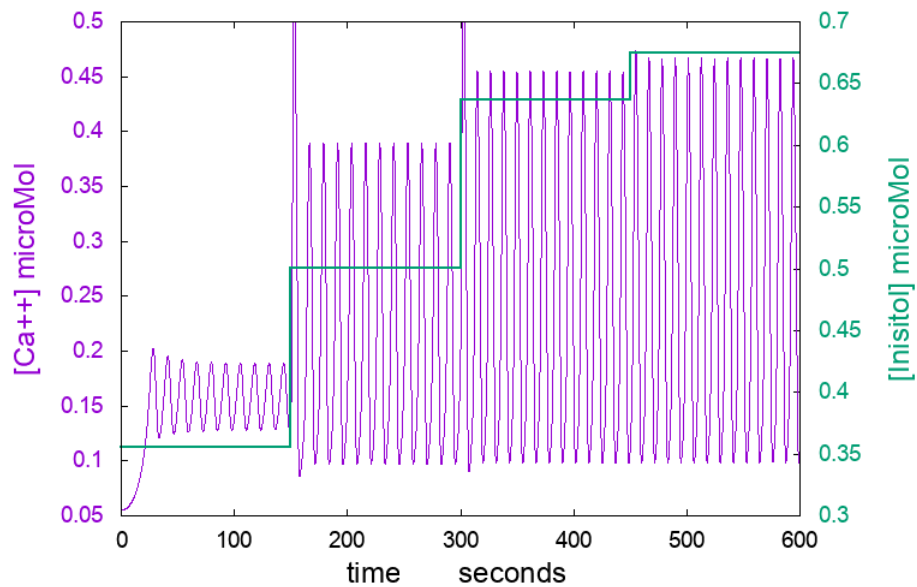
$d_2$  affinità di legame di inattivazione del  $Ca^{2+}$

$d_5$  affinità di legame di attivazione del  $Ca^{2+}$

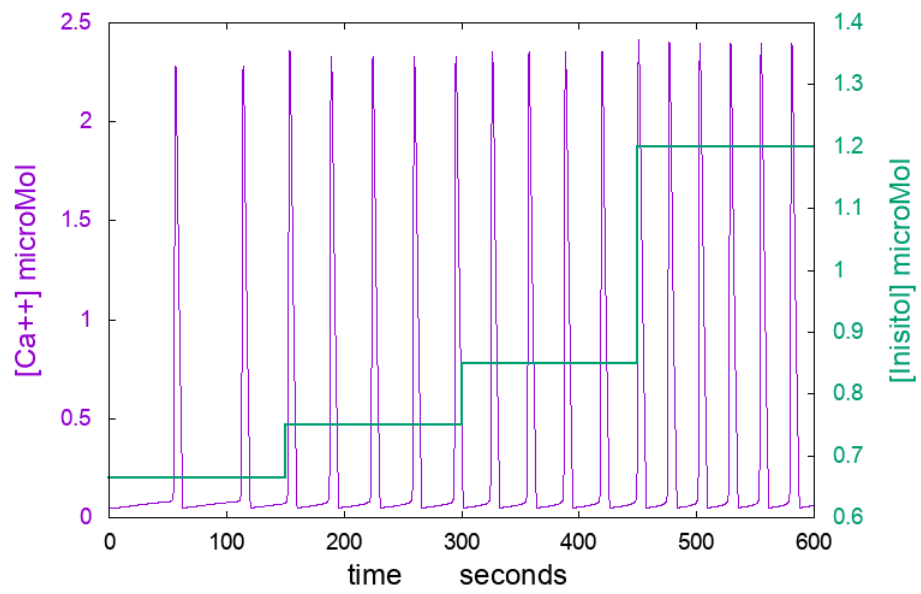
Pertanto, il livello di  $IP_3$  è direttamente controllato dai segnali che colpiscono la cellula dall'ambiente esterno. A sua volta, il livello di  $IP_3$  determina il comportamento dinamico del modello LR. Il segnale del calcio può quindi essere considerato come un'informazione codificata relativa al livello di  $IP_3$ . È stato dimostrato sperimentalmente che i segnali di  $Ca^{2+}$  in risposta a stimoli esterni codificano informazioni attraverso la modulazione di frequenza (FM) [118] o la modulazione di ampiezza (AM) [119].

Di seguito abbiamo esplorato la gamma di parametri biofisici per i quali il sistema modello LR può presentare una modulazione di frequenza (FM) e/o una modulazione di ampiezza (AM) con il livello di  $IP_3$  (I) come parametro di controllo.

A titolo di esempio, riportiamo nelle figure 3.1 e 3.2 la concentrazione di  $Ca^{2+}$  rispetto al tempo, in presenza di una rampa a gradini dei livelli di  $IP_3$ . I valori dei parametri utilizzati, che danno origine alla modulazione di ampiezza e frequenza prevista, sono illustrati nella tabella 3.1.



**Figura 3.1:** I parametri originali di LR (tabella 1) forniscono una modulazione in ampiezza delle oscillazioni a frequenza quasi costante.  $IP_3=0,355; 0,5; 0,637; 0,675$ .



**Figura 3.2:** Una maggiore affinità della pompa SERCA  $Ca^{2+}$  ( $K_p = 0,051 \mu M$ ) è responsabile di oscillazioni con modulazione in frequenza e ampiezza quasi costante.  $IP_3 = 0,6634; 0,75; 0,85; 1,2$ .

**Tabella 3.1:** Parametri biofisici relativi alla modulazione delle oscillazioni di  $Ca^{2+}$  in AM e FM (i parametri per FM sono riportati tra parentesi quadre)

$\Omega_C$	$6 s^{-1}$	$d_1$	$0.13 \mu M$
$\Omega_L$	$0.11 s^{-1}$	$d_2$	$1.049 \mu M$
$O_p$	$0.9 s^{-1}$	$d_3$	$0.9434 \mu M$
$\rho_A$	0.185	$O_2$	$0.2 \mu M^{-1} s^{-1}$
$C_T$	$2.0 \mu M - [4.0]$	$d_5$	$0.08234 \mu M$
$K_p$	$0.1 - [0.051]$	-	-
<b>IP<sub>3</sub> production and degradation</b>			
$O_\beta$	$0.8 \mu M s^{-1}$	$O_\delta$	$0.025 \mu M s^{-1}$
$O_{3k}$	$0.86 \mu M s^{-1}$	$K_\delta$	$0.5 \mu M$
$K_{3k}$	$1.0 \mu M$	$O_{5p}$	$0.86 s^{-1}$

L'implementazione del modello Li-Rinzel e la simulazione dei parametri biofisici ha consentito di ottenere risposte diverse della modulazione del  $Ca^{2+}$  per valori diversi dello stimolo di  $IP_3$ . In particolare, variando il valore di affinità della pompa SERCA per il  $Ca^{2+}$  ( $K_P$ ) da 0.1 a 0.051 vi è il passaggio a oscillazioni con frequenza variabile e ampiezza quasi costante.

L'attenzione sulla codifica in AM o FM del signaling del  $Ca^{2+}$  risulta essere un parametro importante in quanto un meccanismo probabile per la codifica/decodifica delle informazioni dovuto alla frequenza, all'ampiezza e alla forma d'onda delle oscillazioni.

# Capitolo 4

## Metodi sperimentali

### 4.1 Le colture cellulari

Per sviluppare il disegno sperimentale del progetto di tesi sono stati utilizzati diversi modelli cellulari, nello specifico sono state analizzate cellule astrocitarie umane immortalizzate, cellule di ratto wild-type e cellule di ratto knock-out per il gene *Fmr1*, quest'ultimo localizzato sul cromosoma x è responsabile della sindrome di Rett o sindrome dell'X fragile.

- Le colture di astrociti corticali immortalizzati di origine umana sono state fornite da Innoprot (Spagna).

Le cellule sono state coltivate in fiasche da  $25\text{ cm}^2$  di superficie trattate con poli-L-lisina in 5 mL di terreno per astrociti (Innoprot, Spagna) con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) al 2%, integratori per la crescita degli astrociti (AGS) e una soluzione antibiotica contenente penicillina (100 U/mL) e streptomomicina (100 *mug*/mL) (Innoprot, Spagna).

Le cellule sono state incubate a  $37^\circ\text{C}$  in aria umidificata con il 5% di  $\text{CO}_2$ .

Per gli esperimenti sono stati utilizzati astrociti tra il terzo e il settimo pas-

saggio.

- Le colture astrogliali primarie sono state isolate dalla corteccia cerebrale di topi neonati ottenuti da topi wild type (WT) del ceppo murino C57BL6/J e da topi del ceppo murino spesso ma knock-out (KO) per il gene Fmr1 (ceppi forniti dal Dutch- Belgian Fragile X Consortium, 1994).

Le cortecce sono state frammentate mediante dissezione a freddo in soluzione salina bilanciata HBSS-G, sminuzzate manualmente, trattate con l'enzima tripsina e piastrate in fiasche da  $75 \text{ cm}^2$  di superficie a una densità di  $6 \times 10^4$  cellule/ $\text{cm}^2$  (una corteccia per fiasca) in terreno Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) contenente il 10% di FBS e una soluzione antibiotica contenente penicillina (100 U/mL) e streptomicina (100 *µg*/mL).

Dopo 21 giorni le cellule sono state tripsinizzate, contate e riseminate a una densità di  $4 \times 10^4$  cellule/ $\text{cm}^2$  in fiasche da  $25 \text{ cm}^2$ .

#### **4.1.1 Il trattamento delle cellule**

Gli astrociti umani sono stati seminati in piastra da 24 pozzetti alla densità di  $8.0 \times 10^5$  cellule/pozzetto, mentre le colture astrogliali murine sono state piastrate alla densità di  $4.0 \times 10^5$  cellule/pozzetto, date le diverse dimensioni cellulari. In questo modo entrambe le colture hanno raggiunto una confluenza circa del 90% alle 24h.

Il mezzo di coltura è stato sostituito da 0,4 ml di terreno fresco allo 0,5% di FBS (ad eccezione dell'FBS il terreno di coltura ha mantenuto la stessa composizione di quello utilizzato per la crescita della coltura cellulare) ed è stata aggiunta una dose di 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di Fluo-8 AM, colorante fluorescente verde legante il calcio (Abcam, USA).

Dopo 45 minuti, le cellule sono state lavate e il mezzo è stato sostituito con Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS), una soluzione salina bilanciata contenente  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e glucosio 15 minuti prima dell'aggiunta di acido glutammico alla concentrazione di 50  $\mu\text{g/ml}$  (Sigma-Aldrich, USA) o dell'agonista del recettore metabotropico del glutammato (mGluR), la 3,5-diidrossifenilglicina (3,5- DHPG), alla concentrazione di 10  $\mu\text{M}$ .

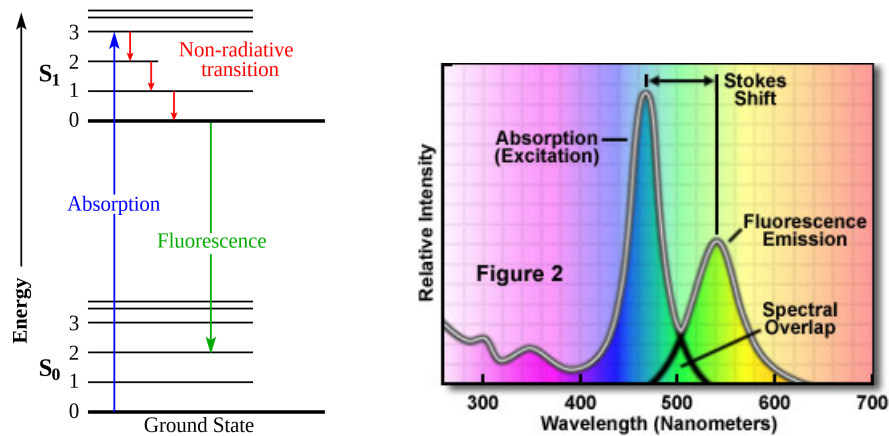
Un'ulteriore serie di piastre sono state trattate con un inibitore potente e altamente selettivo del recettore mGlu5, la 2-Metil-6-(feniletinil)piridina (MPEP), alla concentrazione di 50  $\mu\text{M}$ , 15 min prima dell'aggiunta dell'agonista e del glutammato. Immediatamente dopo le piastre sono state posizionate sul microscopio per l'acquisizione delle immagini in fluorescenza.

## 4.2 L'imaging del Calcio

Il signaling del  $Ca^{2+}$  viene utilizzato da diversi tipi di cellule e la dinamica del segnale varia dai microdomini di  $Ca^{2+}$  alle onde dello stesso ione che si propagano negli astrociti [120]. Questa diversità spiega come non esista un'unica tecnica per monitorare tutte le variazioni di  $Ca^{2+}$ , tuttavia le metodologie di imaging attraverso l'uso della microscopia a fluorescenza risultano essere tra le migliori metodologie per analizzare questi segnali.

La fluorescenza è un processo fisico nel quale un materiale assorbe fotoni e.m. in uno specifico range di frequenze che vengono però riemessi a frequenza minore. In pratica, come illustrato in Fig.4.1, il fotone assorbito porta il sistema dallo stato fondamentale  $S_0$  in uno stato eccitato elettronico-vibrazionale, questo stato decade rapidamente tramite transizioni vibrazionali non radiative al livello fondamentale dello stato elettronico eccitato  $S_1$  a

cui segue il decadimento allo stato fondamentale con emissione di un fotone di maggiore lunghezza d'onda di quello assorbito.



**Figura 4.1:** *A sinistra una rappresentazione del processo di emissione di fluorescenza, a destra un esempio di bande di assorbimento ed emissione caratteristiche di un fluorescente.*

La microscopia a fluorescenza utilizza questo processo per evidenziare specifiche strutture o molecole nel campione in esame, marcandolo con particolari sostanze fluorescenti detti fluorofori.

Ciò è possibile illuminando il campione in esame con una lunghezza d'onda nella banda di eccitazione del fluoroforo ed osservando l'immagine del microscopio nella banda di emissione.

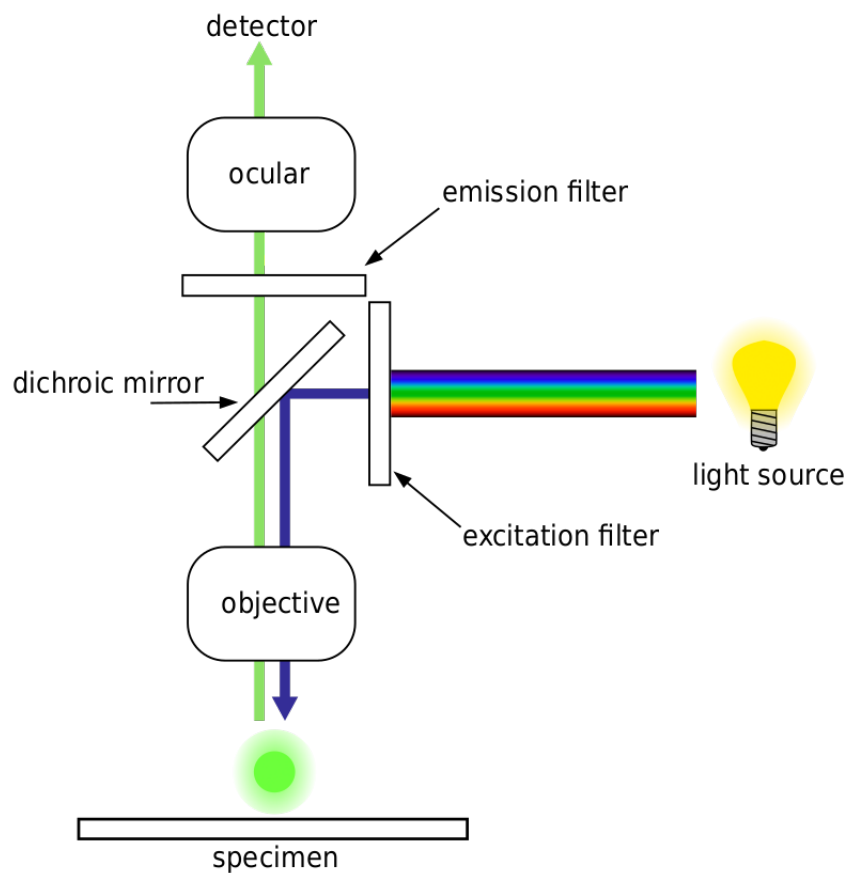
In un microscopio a Epifluorescenza questo viene realizzato utilizzando lo schema illustrato in Fig. 4.2, dove la luce del campo di illuminazione del campione viene dapprima filtrata da un filtro passa banda, ottimizzato sulla frequenza di eccitazione del fluoroforo, quindi inviata sul campione attraverso l'obiettivo, utilizzando uno specchio dicroico calibrato all'incrocio delle bande emissione e assorbimento.

La luce emessa dal campione viene raccolta dall'obiettivo e riattraversa lo specchio dicroico che riflette la componente nella banda di eccitazione e tra-



smette invece quella nella banda di emissione. Quest'ultima viene ulteriormente filtrata da un filtro passa banda ottimizzato sulla frequenza di emissione e quindi raggiunge l'oculare o un eventuale dispositivo di registrazione d'immagini.

Questo sistema ha il vantaggio di concentrare il campo d'illuminazione nella zona da osservare e inoltre raccogliendo la luce retrodiffusa migliora il contrasto rispetto ad una illuminazione frontale.

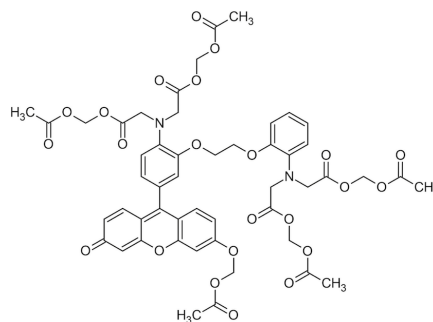


**Figura 4.2:** Schema di funzionamento di un microscopio a epifluorescenza.

Al fine di ottenere una buona visualizzazione del signaling del  $Ca^{2+}$  è necessario scegliere il marcatore in base al progetto sperimentale da ottenere.

L'efficienza del fluoroforo dipende da molti fattori quali: la sua concentrazione, la localizzazione citosolica, la lunghezza d'onda e la durata dell'eccitazione (photbleaching), l'estruzione o la compartimentazione dello stesso. Possono alterare le proprietà del marcatore utilizzato anche il pH e la viscosità.

In questo lavoro è stato utilizzato il fluorocromo Fluo-8 dell'azienda Abcam-Italia per misurare la concentrazione intracellulare di  $Ca^{2+}$ , poiché presenta una serie di vantaggi rispetto ai classici coloranti fluorescenti: è molto più luminoso dei fluorofori della stessa categoria, il caricamento della cellula può essere effettuato a temperatura ambiente, cioè in condizioni meno difficili rispetto ad altri fluorofori che richiedono  $37^{\circ}C$  per un caricamento ottimale, può attraversare la membrana cellulare. Una volta all'interno della cellula, i gruppi lipofili bloccanti del Fluo-8 vengono scissi dalle esterasi, dando origine a un colorante fluorescente con carica negativa che rimane all'interno delle cellule e la cui fluorescenza viene notevolmente potenziata quando si lega al calcio. Nella Fig.4.3è illustrata lo struttura molecolare del Fluo-8 mentre nella tabella 4.1 sono elencate le principali caratteristiche del fluoroforo.



**Figura 4.3:** *Struttura molecolare del Fluo-8 AM, green fluorescent calcium binding dye (ab142773).*

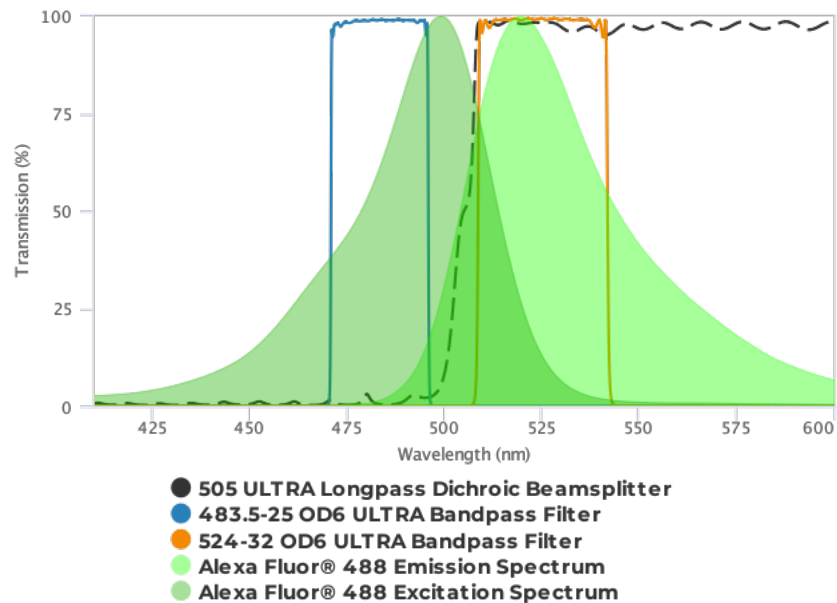
**Tabella 4.1:** *Proprietà spettrali del Fluo-8*

Fattore di correzione (260 nm)	1.076
Fattore di correzione (280 nm)	0.769
Coefficiente di estinzione ( $cm^{-1} M^{-1}$ )	23430
Eccitazione (nm)	495
Emissione (nm)	516
rendimento quantistico	0.16 <sup>1</sup>

### 4.3 Il sistema ottico

Avendo la necessità di osservare il segnale di  $Ca^{2+}$  in colture cellulari di astrociti in condizioni controllate e vicine a quelle fisiologiche, cioè  $T = 35$  °C, saturazione di  $CO_2$  e umidità 77%, si è reso necessario modificare un microscopio invertito per colture di tessuti e cellule, modello Olympus CK2, al fine di poterlo inserire all'interno di un incubatore per culture cellulari, dove non sarebbe stato possibile alloggiare ed operare un ordinario microscopio a fluorescenza. Il microscopio originale è stato modificato inserendo nel percorso ottico dall'obiettivo all'oculare uno specchio dicroico (Alluxa 505 Ultra Longpass) a 45° illuminato lateralmente da un LED ad elevata luminosità (Thorlab M470L4), dotato di un filtro (Alluxa 483.5-25 OD6 Ultra). Un ulteriore filtro (Alluxa 524-32 OD6 Ultra) è stato posto in prossimità dell'oculare. La combinazione dei vari elementi ottici, insieme alle bande di assorbimento ed emissione del fluoroforo è mostrata in Fig. 4.4. Anche il sistema di illuminazione diretta del campione è stato modificato sostituendo la originale lampada ad incandescenza del condensatore ottico con una luce LED bianca la cui accensione e luminosità viene controllata tramite il Rasp-

berry permettendo così di ottenere anche immagini del campione in campo chiaro.

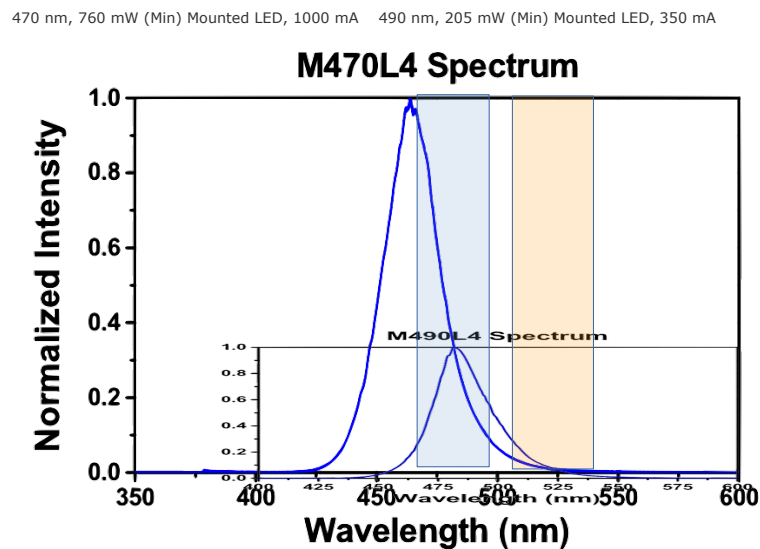


**Figura 4.4:** *Elementi ottici: in verde la banda di eccitazione/emissione del fluoroforo, in blu/arancione la trasmissione dei filtri di eccitazione/emissione, il tratteggio è riferito allo specchio dichroico*

Nella scelta della fonte di illuminazione si è rinunciato alla classica sorgente utilizzata comunemente nei microscopi a fluorescenza, ovvero una lampada a scarica, in favore di una sorgente LED di opportuna lunghezza d'onda. Di fatto l'inserimento di una lampada a scarica, che peraltro genera una discreta quantità di calore, all'interno dell'incubatore sarebbe stato piuttosto difficoltoso, d'altra parte sono tutt'oggi disponibili sorgenti LED di varie lunghezze d'onda e adeguate in termini di potenza radiante.

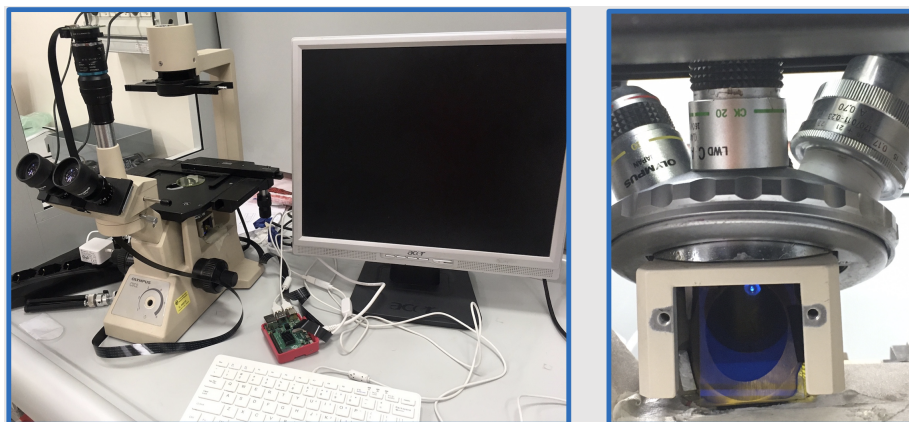
Il parametro di scelta del LED da utilizzare è stato quello di massima trasmissione di intensità luminosa attraverso la finestra del filtro di eccitazione.

Nella disponibilità di sorgenti LED sul mercato la scelta è caduta sul modello M470L4 della Thorlabs che, sebbene non sia ben centrato nella finestra di trasmissione, riesce a trasferire maggiore energia rispetto al modello M490L4 grazie alla maggiore irradianza. Il confronto tra i due tipi di LED è illustrato in Fig. 4.5 dove si osserva anche che la coda dello spettro del LED M470L4 si estende meno nella zona di emissione.



**Figura 4.5:** Distribuzione spettrale della luce emessa dai LED a 490 e 470 nm, confrontata con le finestre di eccitazione ed emissione utilizzate sul microscopio

La registrazione delle immagini è stata realizzata utilizzando dei sensori CMOS ad alta risoluzione, adattati alle ottiche del microscopio ed interfacciate con un computer Raspberry PI4 per automatizzare le sequenze di acquisizione. In Fig. 4.6 è mostrato l'intero sistema utilizzato per la raccolta di immagini in epifluorescenza su culture cellulari poste all'interno del sistema di incubazione.



**Figura 4.6:** *Microscopio appositamente adattato per l'epifluorescenza; a destra il dettaglio del posizionamento dello specchio dicroico*

Il Raspberry Pi4 model B è un mini PC dotato di processore quad-core da 1.5GHz a 64-bit ARM Cortex-A72 CPU, con GPU dedicata alla telecamera, 2 micro-HDMI, dotato di 4 GB di RAM, con accesso LAN, WiFi, USB 3.0 e bluetooth.

Il disco di sistema è installato su micro SD card ed è in grado di offrire prestazioni paragonabili a sistemi PC x86 entry-level.

Sulla microSD è possibile installare svariati sistemi operativi della famiglia Linux, tra i quali Raspbian basato sulla distribuzione Linux Debian.

Infine è dotato di connettore GPIO general-purpose input/output standard a 40 pin che permette di collegare, configurare e gestire dispositivi elettronici/digitali.

Nella registrazione delle immagini sono stati testati due sensori differenti: IMX477 e IMX462 entrambi prodotti dalla Sony e disponibili nelle camere High Quality Camera di Raspberry inc. e Ultra Low Light Camera della Arducam, mostrate nellaFig.4.7. Il primo sensore presenta una risoluzione di 12 Mpixel mentre il secondo di minore risoluzione (2Mpixel) presenta una mag-

giore sensibilità. Mentre il primo sensore permette di acquisire delle ottime immagini con elevato dettaglio è risultato meno efficace nella acquisizione di sequenze di immagini in time-lapse. Infatti il fenomeno del photo-bleaching del fluoroforo risultava importante dopo alcune sequenze di acquisizione. Di contro utilizzando il sensore IMX462 è stato possibile ridurre l'illuminazione sul campione e minimizzare il fenomeno del photo-bleaching.



**Figura 4.7:** *High Quality Camera 12Mpx di Raspberry inc. (a sinistra) e Ultra Low Light Camera 2Mpx della Arducam (a destra).*

L'utilizzo integrato dei dispositivi utilizzati e collegati con il Raspberry è stato implementato in linguaggio Python ricorrendo anche alle svariate librerie disponibili. In particolare l'uso delle librerie PiCamera e Libcamera, finalizzate al supporto delle camere direttamente dai sistemi operativi Linux, ci ha permesso di avere accesso facilitato a ai diversi parametri relativi all'acquisizione delle immagini, quali framerate, sensibilità, velocità dell'otturatore e così via.

Questo risulta particolarmente importante nell'acquisizione di *immagini tecniche* dove non si vuole che la telecamera aggiusti i parametri di acquisizione per migliorare l'estetica delle immagini.

Abbiamo quindi sviluppato diversi codici che realizzano dapprima una im-

magine in campo chiaro e di seguito una serie di esposizioni in time lapse, sincronizzate con l'accensione del LED di eccitazione.

Con codici simili sono state anche realizzate acquisizioni veloci, in particolare con il sensore IMX462, riuscendo ad acquisire fino a 200 frame al secondo.

Nelle appendici vencono illustrati i codici Python utilizzati.



# Capitolo 5

## Trattamento dei dati

L'analisi dei dati funzionali degli astrociti è impegnativa in quanto i cambiamenti nella concentrazione di  $Ca^{2+}$  citosolico negli astrociti avvengono in tre dimensioni spaziali e nel tempo. Tuttavia, gli eventi di  $Ca^{2+}$  astrocitari sono rilevati monitorando l'intensità della fluorescenza dell'indicatore di  $Ca^{2+}$  in un singolo piano focale. Ogni evento può avere una diffusione, una velocità e un profilo temporale caratteristici, questo richiede una modellizzazione sofisticata per massimizzare l'estrazione delle informazioni.

Le variazioni di intensità, rilevate dal microscopio a fluorescenza, sono state elaborate con il software open-source ImageJ, in particolare con la distribuzione Fiji, dedicata all'analisi delle immagini biologiche.

Il programma utilizza le moderne pratiche di ingegneria per combinare potenti librerie di software con un'ampia gamma di linguaggi di scripting per consentire una rapida prototipazione di algoritmi di elaborazione delle immagini [121] [122].

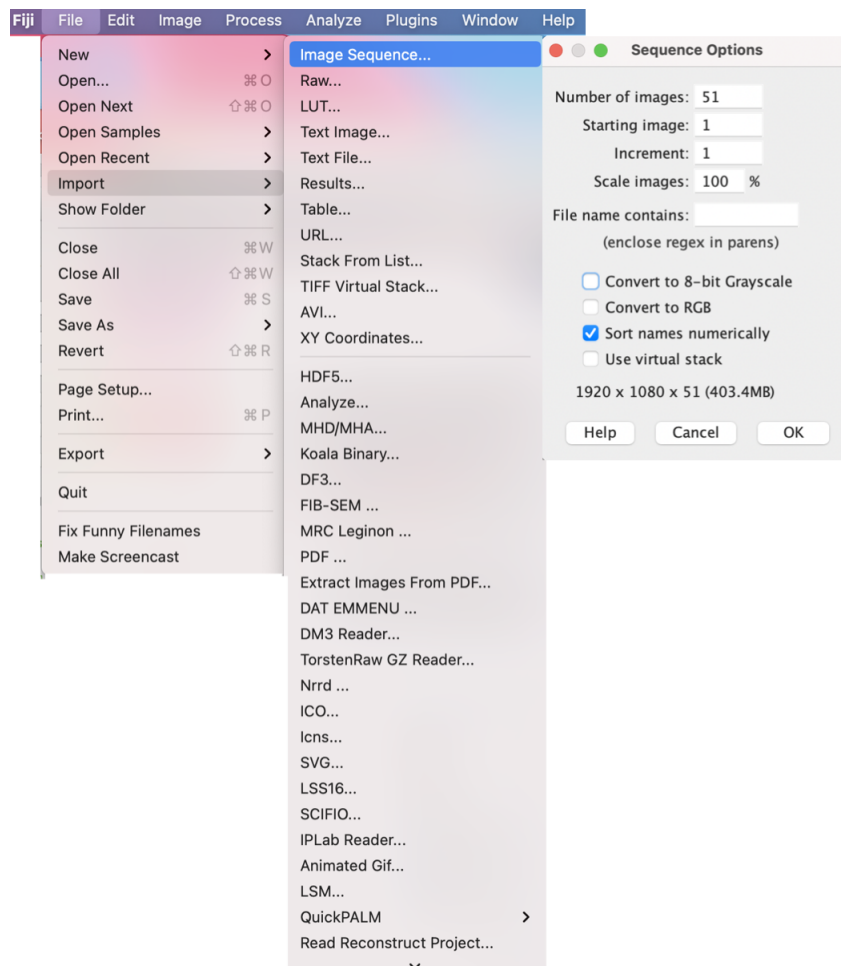
Per l'analisi delle immagini delle cellule astrocitarie è stato adottato il seguente protocollo:

- Apertura della sequenza di immagini raccolte dalla telecamera:

File > Import > Image sequence

Fiji è in grado di riconoscere automaticamente tutti i formati di immagine standard, come: .jpg, .tif e .png, nonché i formati di file di alcuni fornitori di microscopi.

Dalla finestra di dialogo, sono state selezionate le opzioni mostrate in figura.



**Figura 5.1:** Importazione della sequenza di immagini.

- L'immagine catturata dalla fotocamera è un'immagine a colori in formato RGB in cui ogni pixel ha tre valori che riflettono l'intensità di ogni componente principale del colore, rosso, verde e blu, ciascuno in formato 8 bit.

Quando si misura l'intensità di un'immagine RGB, imageJ calcola la media delle intensità di ciascun canale,  $(R + G + B)/3$ .

Dal momento che è stato utilizzato un singolo fluoroforo con emissione sul canale verde, si è scelto di separare i canali rossi e blu vuoti e rumorosi:

Image > Colour > Split Channels .

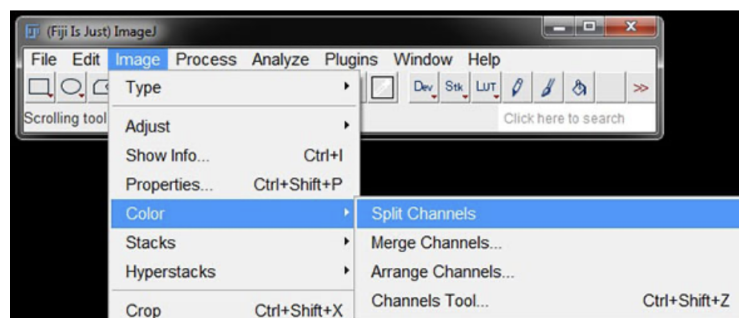
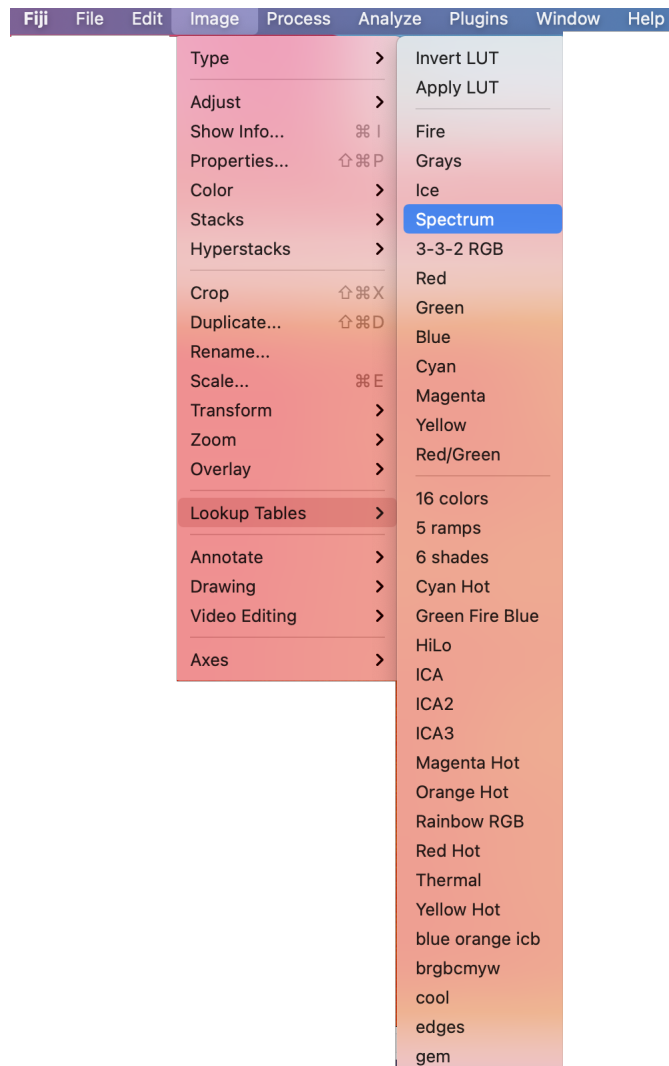


Figura 5.2: Separazione dei canali vuoti e rumorosi.

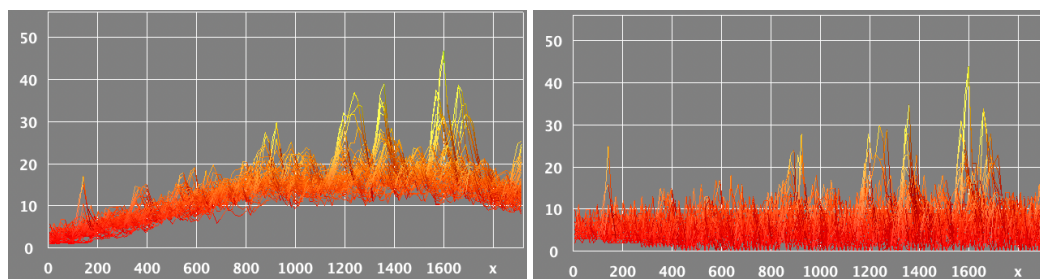
- L'immagine monocromatica (verde) viene restituita in toni di grigio. Per aumentare la visibilità delle caratteristiche a basso contrasto e aiutare l'occhio umano a confrontare immagini diverse, esaltando le differenze di intensità dei campioni, è stata applicata una tabella di look-up (LUT), nello specifico la "LUT spectrum"

Image > Lookup Tables > Spectrum



**Figura 5.3:** Tabella look-up, scelta della LUT Spectrum

Il passo successivo consiste nella correzione dello sfondo non uniformemente illuminato.



**Figura 5.4:** Immagine prima (A) e dopo(B) la sottrazione dello sfondo.

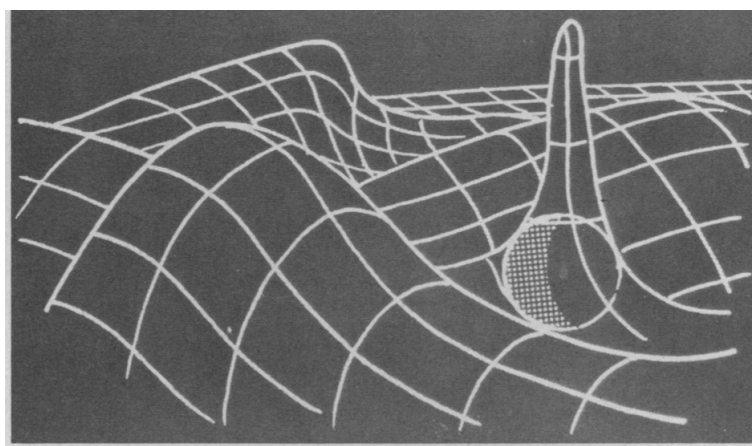
A tal fine è stato utilizzato un algoritmo chiamato *"Rolling ball radius"*, che funziona come un filtro.

Immaginiamo di immergere una pallina sotto la superficie nel punto desiderato. Una volta che è completamente coperta dai blocchi, l'apice della sfera determina l'intensità dello sfondo in quella posizione. Facendo rotolare la sfera sotto la superficie si ottengono i valori dello sfondo per l'intera immagine. Il raggio della sfera è stato impostato su un valore maggiore della struttura astrocitaria più grande [123]. E' stata utilizzata l'opzione *"Paraboloide scorrevole"*: in questo caso la sfera rotante è sostituita da un paraboloide rotante scorrevole con la stessa curvatura al vertice della sfera di raggio dato.

Il paraboloide ha il vantaggio di poter trovare i paraboloidi adatti per qualsiasi valore dell'immagine, anche se i valori dei pixel sono molto più grandi (in pixel) della dimensione tipica delle celle degli oggetti:

```
Process> Subtract Background].
```

- Le immagini ottenute sono state salvate in formato .tif per le successive analisi:



**Figura 5.5:** *Rappresentazione schematica dell'algoritmo della sfera rotante utilizzato per la normalizzazione dello sfondo. La sfera segue i contorni lisci dello sfondo. Il rotolamento della sfera è equivalente all'erosione e alla dilatazione di un elemento strutturante sferico.*

File> Save As> tif

Dopo la preelaborazione delle immagini si è proceduto all'analisi del segnale del calcio intracellulare nelle cellule astrocitarie.

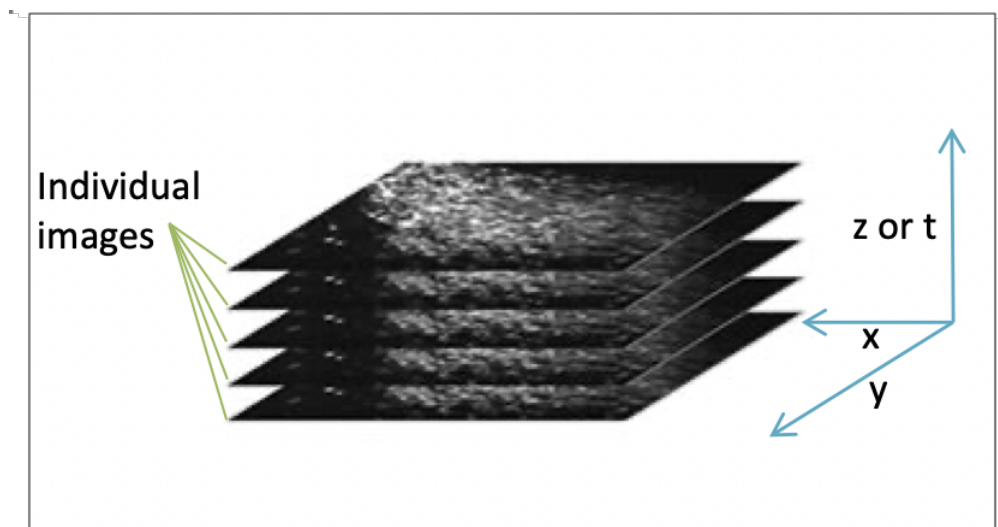
Poichè i nostri obiettivi sperimentali prevedevano l'analisi della dinamica del calcio in ogni cellula, si è proceduto all'identificazione manuale di ogni astrocita attraverso la creazione di regioni di interesse (ROI).

Le ROI vengono utilizzate per definire parti specifiche di un'immagine che devono essere elaborate o misurate in modo indipendente, quindi, solo i pixel all'interno della ROI selezionata saranno inclusi nei calcoli al momento dell'esecuzione delle misurazioni. Possono essere selezionate attraverso varie opzioni presenti nella barra degli strumenti (rettangoli, cerchi, linee, punti, poligoni, forme a mano libera) e sono invariabilmente 2D.

Dalla visualizzazione del video realizzato è evidente che gli astrociti sono caratterizzati da attenuazioni di intensità dovute all'andamento oscillatorio del  $Ca^{2+}$  intracellulare, risulta quindi complicato individuare il momento di maggiore intensità durante lo scorrere della serie temporale ed attribuire a questo una specifica ROI. Per ovviare a tale problema è stata realizzata una singola immagine composta dalla somma delle immagini correlate temporalmente sovrapposte una sull'altra, formando una "pila" di immagini.

Questo è stato ottenuto con il comando :

```
Image> Stack> Project Z> Sum.
```



**Figura 5.6:** Somma delle singole immagini di una serie temporale.

Il passo successivo è stato la scelta delle analisi da eseguire dal menu:

Analyze> Set Measurements

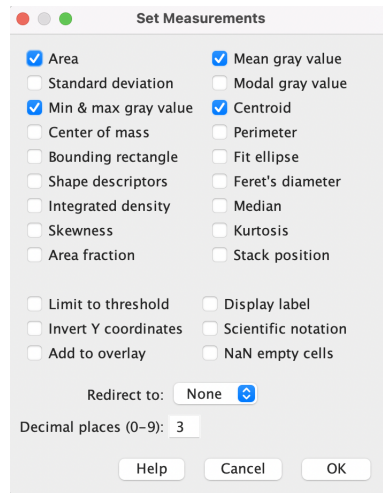


Figura 5.7: Pannello per la scelta delle misure da eseguire.

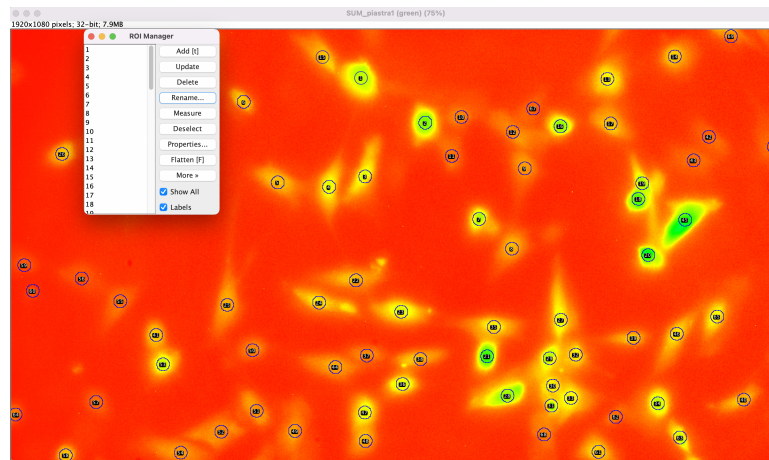


Figura 5.8: Tracciamento delle Regioni di Interesse (ROI) nella somma di stack di immagini.

- Sull'immagine Stack realizzata, con lo strumento "cerchio", è stata disegnata al centro di ogni struttura una ROI circolare. Ogni ROI è stata nominata e aggiunta allo strumento ROI Manager:



Analyze> Tools> Roi Manager .

- L'immagine è stata salvata in formato .tif e il RoiSet in formato zip.
- E' stata aperta la sequenza temporale, e su questa sono state trasposte le ROI eseguite sull'immagine stack e salvate in precedenza sul RoiSet:

Analyze> Tools> Roi Manager

In ROI Manager, per scegliere il Roi.zip di riferimento sono stati usati i comandi:

More> Open

- I comandi

More> Multi Measure

in ROI Manager hanno consentito di ottenere le misure prescelte. L'output Results consiste in un file .csv come testo delimitato, in cui le colonne corrispondono a ciascuna ROI definita in ROI Manager e le righe corrispondono ai fotogrammi dell'immagine.

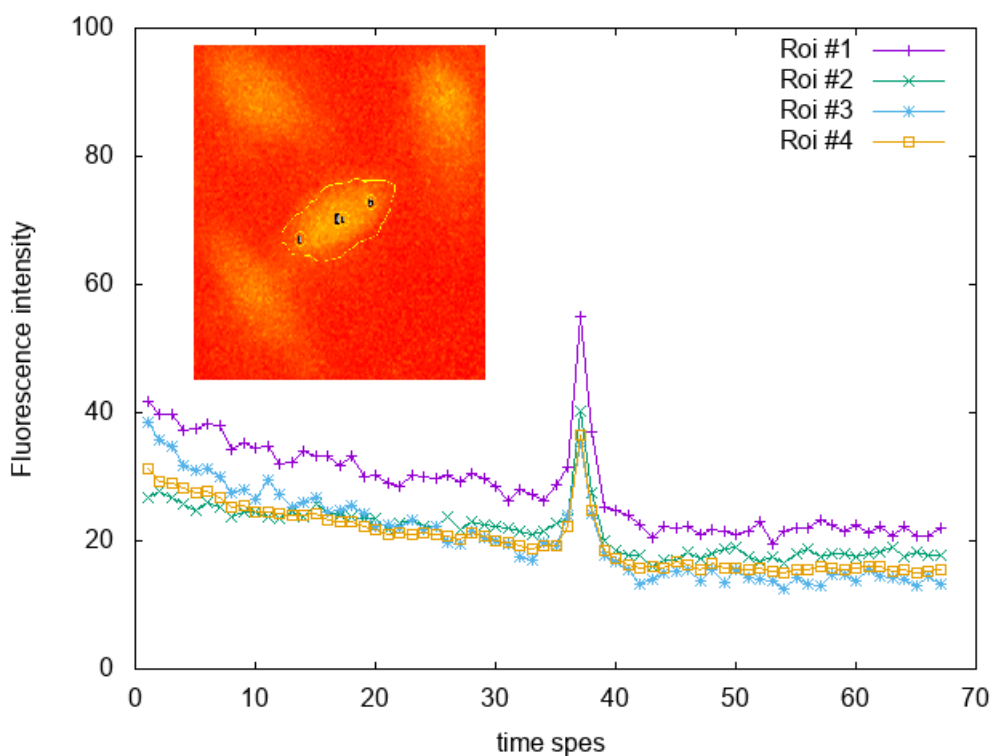
- Il file di output Results è stato salvato per le successive analisi statistiche.

## 5.0.1 Determinazione della posizione delle ROI

Per determinare la posizione migliore della ROI all'interno delle cellule astrocitarie, sono stati confrontati i risultati di diverse selezioni di ROI sullo stesso astrocita.

Come mostrato nell'inserito della Fig. 5.9, sono state disegnate quattro ROI: sull'intera cellula (1), una nel centro della cellula (4) e altre due nelle regioni periferiche (2 e 3).

La fluorescenza misurata rispetto al tempo è riportata in Fig. 5.9:



**Figura 5.9:** Grafico del segnale delle intensità medie delle Regioni di Interesse (ROI) selezionate.

Nella figura, è possibile notare che il grafico delle singole ROI è perfettamente comparabile. Questo ha permesso di concludere che ovunque si

misuri all'interno della cellula astrocitaria il segnale di  $\text{Ca}^{2+}$  è sia evidente che comparabile, anche se al centro della cellula sembra essere più intenso.



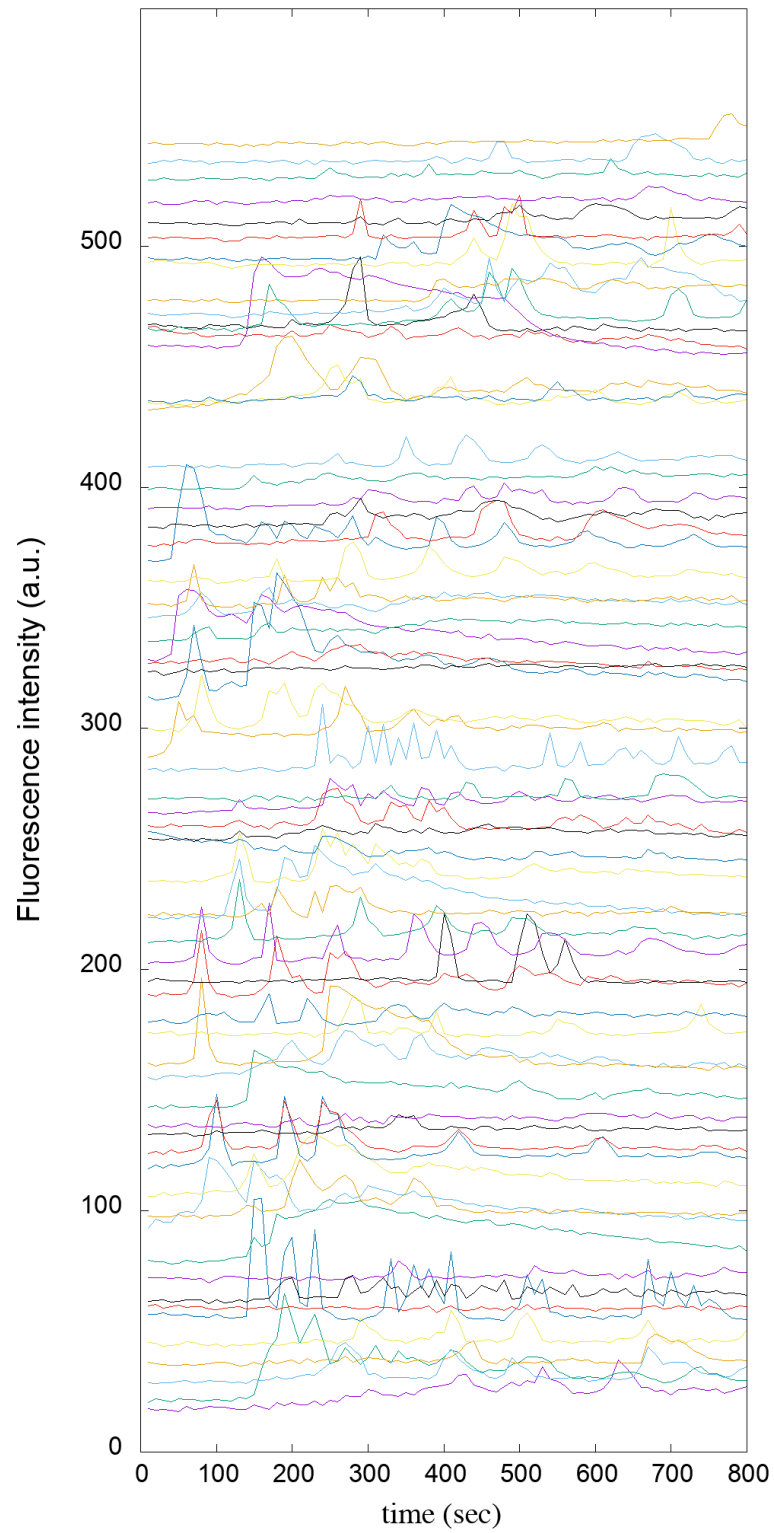
# Capitolo 6

## Analisi

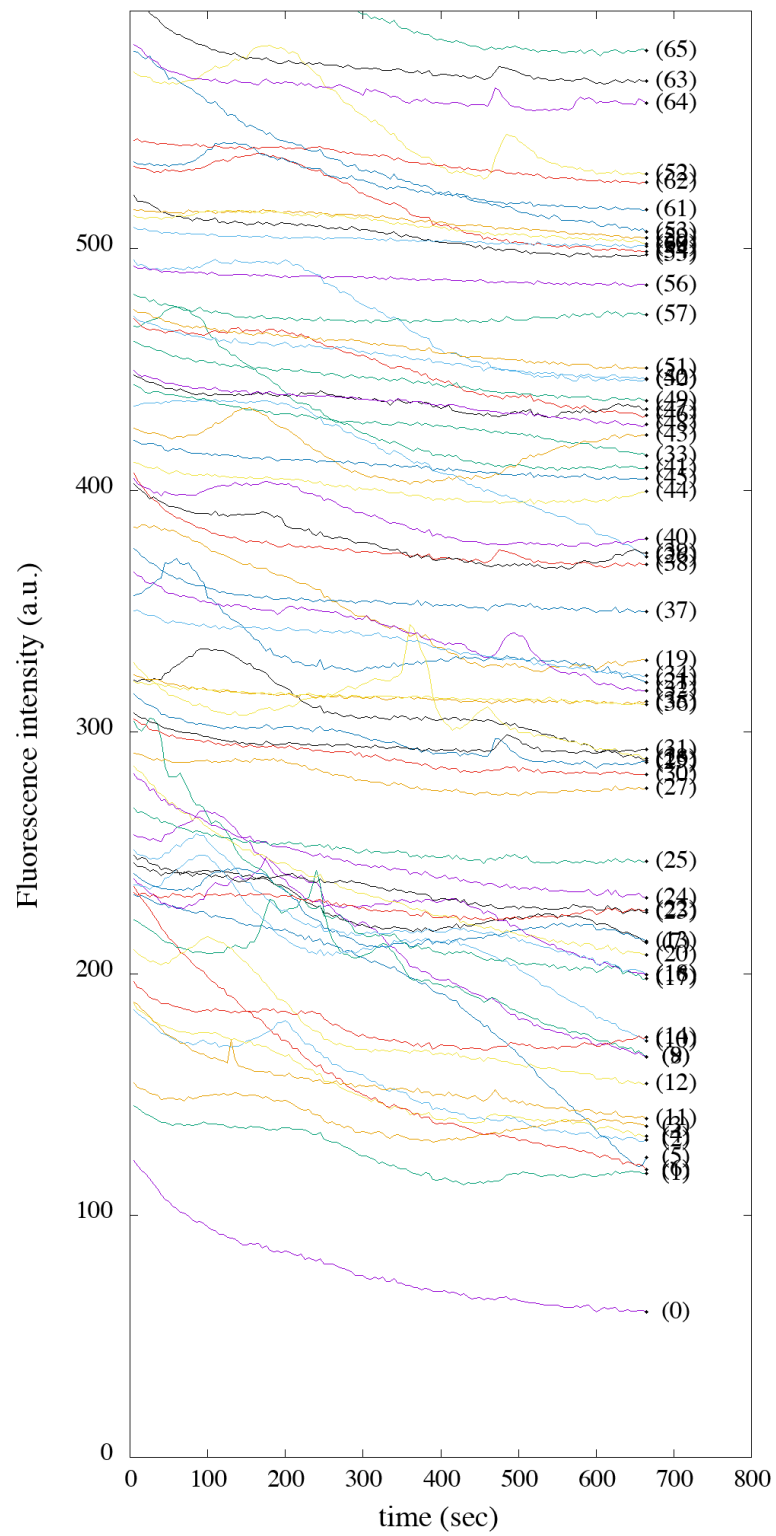
### 6.1 analisi dei dati

L'analisi dei dati è stata eseguita con l'ausilio del software Imagej Fiji e script personalizzati in Gnuplot. Il primo passo consiste nella stesura di uno script personalizzato in gnuplot (vedi appendice 2) per la realizzazione di un file dati e del relativo grafico dell'intensità in funzione del tempo.

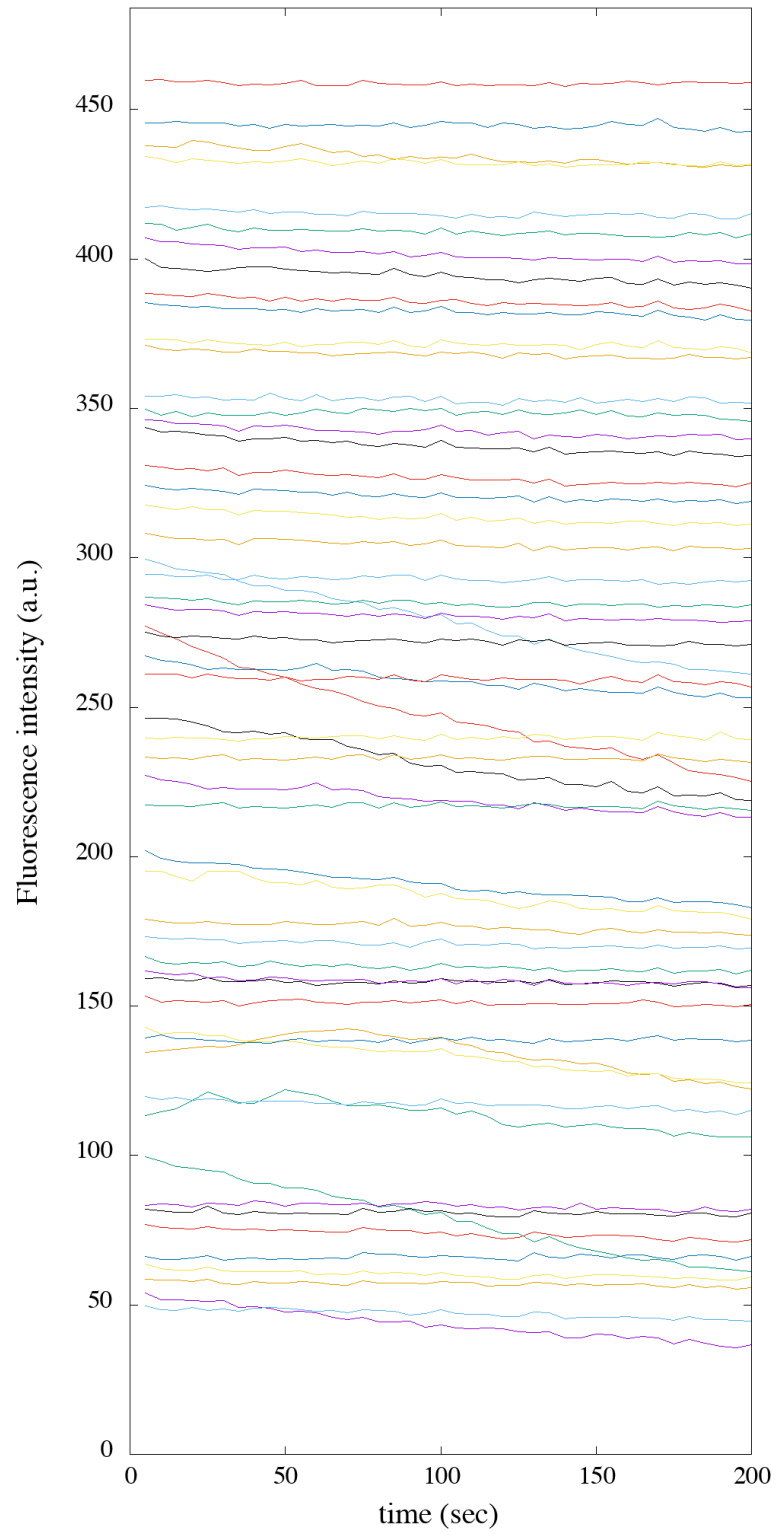
Dal confronto tra le fig.6.1, 6.2, 6.3, è possibile constatare che la dinamica del  $Ca^{2+}$  assume un andamento diverso a seconda che si tratti di cellule astrocitarie umane, murine o murine con patologie.



**Figura 6.1:** Visualizzazione della dinamica spazio-temporale del  $Ca^{2+}$  in cellule astrocitarie umane immortalizzate.



**Figura 6.2:** Visualizzazione della dinamica spatio-temporale del  $Ca^{2+}$  in cellule astrocitarie di topo Wild-type.



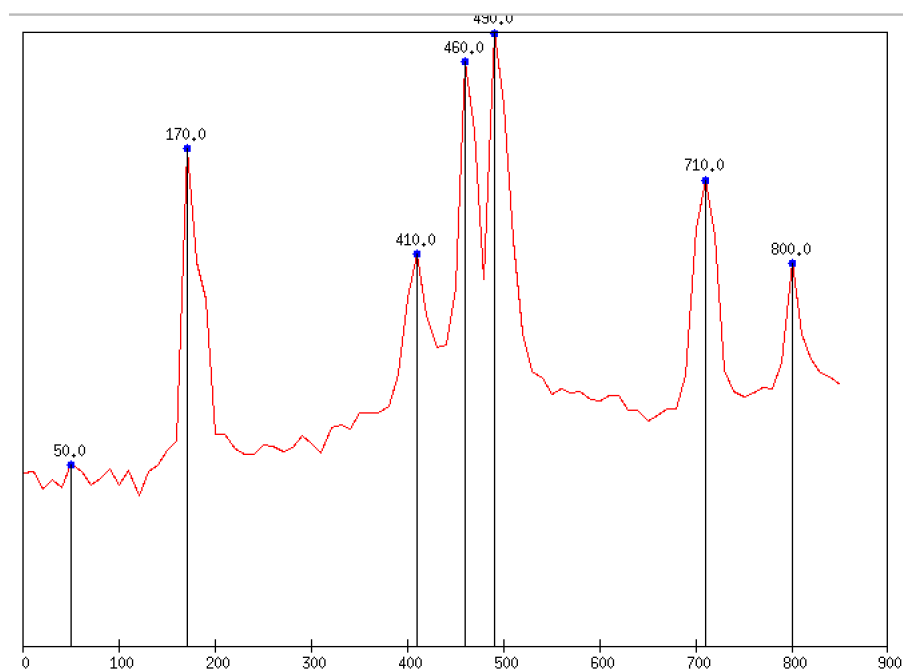
**Figura 6.3:** Visualizzazione della dinamica spatio-temporale del  $\text{Ca}^{2+}$  in cellule astrocitarie di topo   
 68 *Knock-out per il gene dell'X fragile.*



Successivamente, uno script personalizzato su Gnuplot ha permesso di determinare i picchi intracellulari di  $Ca^{2+}$  di ciascun astrocita attraverso il calcolo della prominentezza, che misura la distanza verticale tra il picco e la sua linea di contorno più bassa.

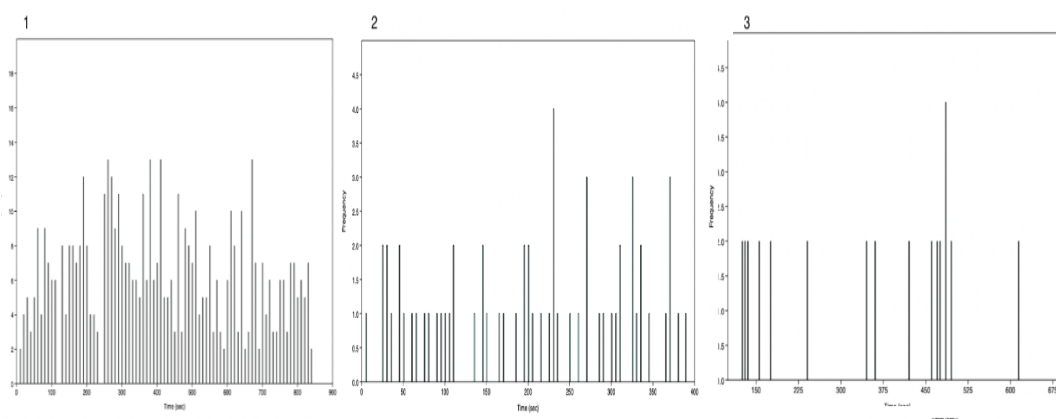
Per il rilevamento dei picchi è stato fissato un valore di soglia al di sopra del quale un'oscillazione viene identificata come picco e non come rumore di fondo. La selezione del valore di soglia non è banale e può falsare i risultati includendo eventi falsi positivi o escludendo eventi  $Ca^{2+}$  autentici.

Per la discriminazione segnale/rumore è stato impostato un valore di soglia 10 e un'altezza di prominentezza 10.



**Figura 6.4:** Rilevamento dei picchi di  $Ca^{2+}$  con il metodo della prominentezza

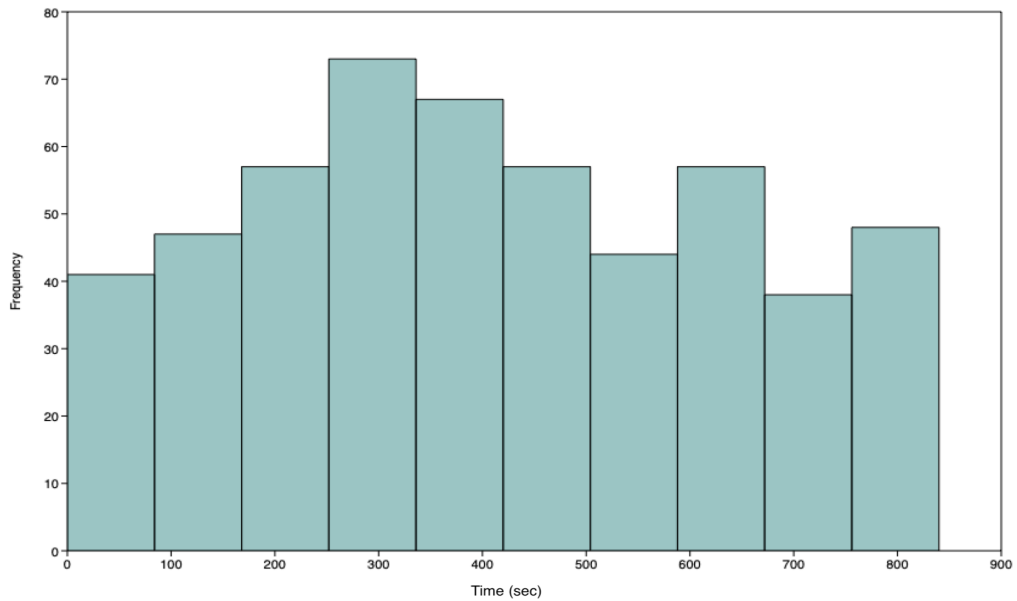
L'intensità degli spikes di  $Ca^{2+}$  per unità di tempo ha consentito di calcolare il numero totale di contributi per campione, la media degli spike nell'intervallo di un minuto, nonché il numero di contributi in un intervallo di tempo predeterminato.



**Figura 6.5:** 1) Numero totale di spike di  $Ca^{2+}$  per astrociti umani immortalizzati 2) astrociti murini wild-type 3) astrociti murini knock-out

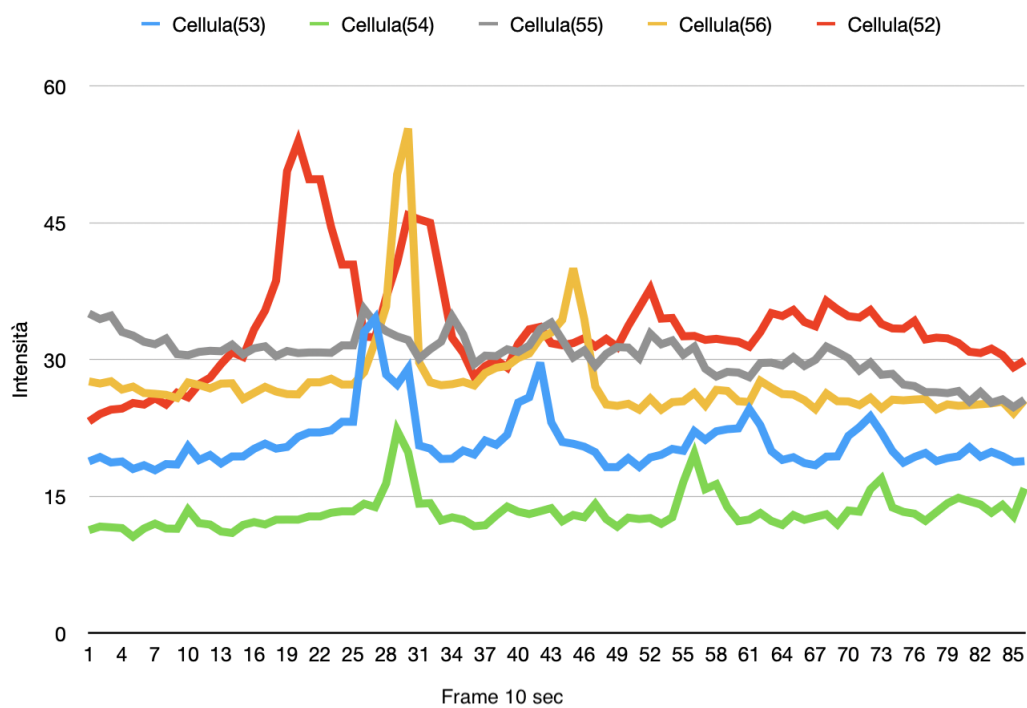
La distribuzione dei contributi di  $Ca^{2+}$  in funzione dei valori discreti presi in considerazione ci fornisce delle preziose informazioni circa la dinamica di rete. Lo studio dell'istogramma infatti, ci ha consentito di individuare le cellule che comunicano tra loro attraverso una sequenza di spike di  $Ca^{2+}$ . Difatti, considerando che la durata media di calcio equivale a circa 80 sec., generando istogrammi con questo intervallo, astrocidi che sparano in modo sincrono o in sequenza ricadono nello stesso intervallo di tempo permettendone così l'identificazione.

Questo è illustrato nella fig. 6.6 in cui si osserva un picco di contributi in prossimità di 300 sec.

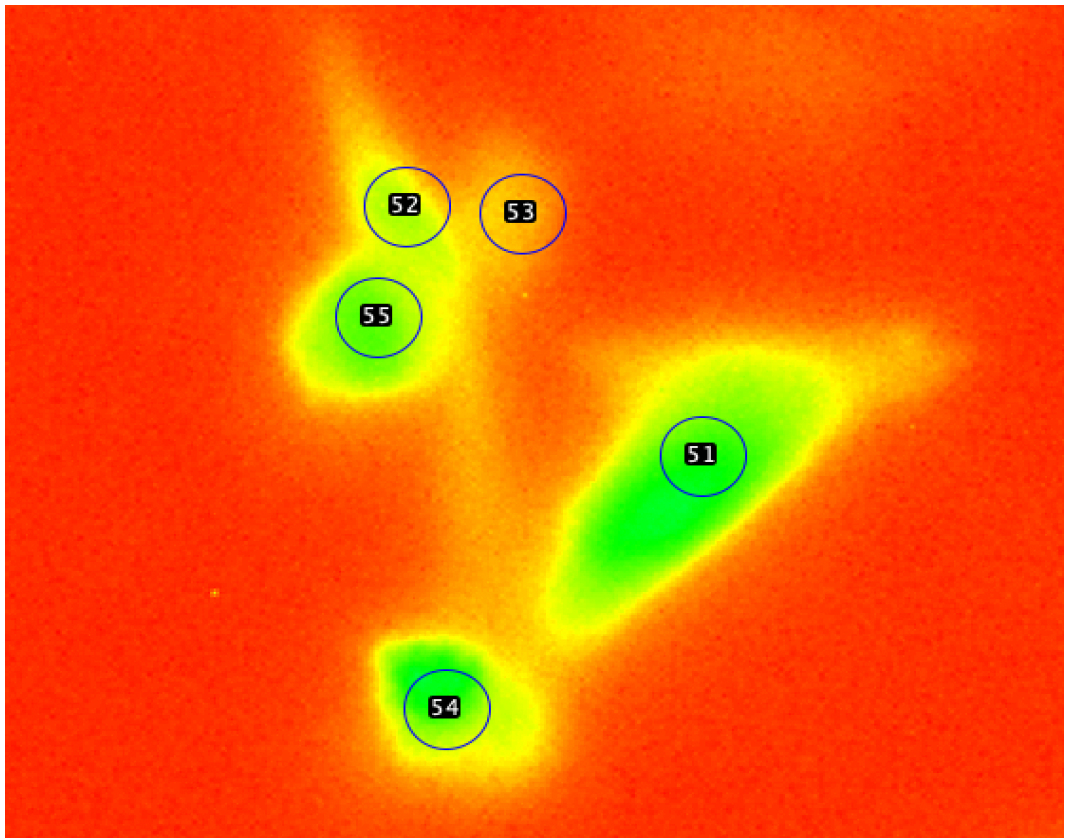


**Figura 6.6:** Esempio di istogramma dell'evoluzione temporale di tutti i contributi di  $Ca^{2+}$  di un campione di astrociti umani immortalizzati. I dati sono raggruppati in intervalli di 83 sec.

Andando a verificare nella sequenza delle immagini a quel valore temporale è possibile osservare la simultaneità degli eventi e individuare gli astrociti coinvolti, vedi fig 6.7 e 6.8



**Figura 6.7:** Grafico relativo all'istogramma precedente della sequenza di spike di  $Ca^{2+}$  di cellule astrocitarie umane. In ascissa sono rappresentati i frame presi ad un intervallo di 10 secondi.



**Figura 6.8:** Immagine delle cellule identificate nel grafico precedente.



# Capitolo 7

## Risultati e Conclusioni

### 7.1 Risultati

#### 7.1.1 Astrociti umani

L'aumento di  $Ca^{2+}$  negli astrociti durante l'attività sinaptica sembra ascrivibile principalmente all'attivazione del recettore metabotropico del glutammato (mGluR) [124] [125]. È stato infatti accertato che il recettore di superficie sensibile al glutammato, i.e. mGluR5, regola molteplici forme di interazione astrocita-neurone, inclusi aspetti che riguardano l'involucro sinaptico e il trasporto del glutammato nelle prime fasi dello sviluppo.

In particolare, il *signaling* mGluR5 è un regolatore positivo dell'espressione e della funzione del trasportatore del glutammato degli astrociti, una componente essenziale della regolazione della segnalazione eccitatoria nell'ippocampo. Dopo lo sviluppo iniziale, l'espressione di astrociti mGluR5 è sottoregolata, ma riemerge in modelli di animali con patologie.

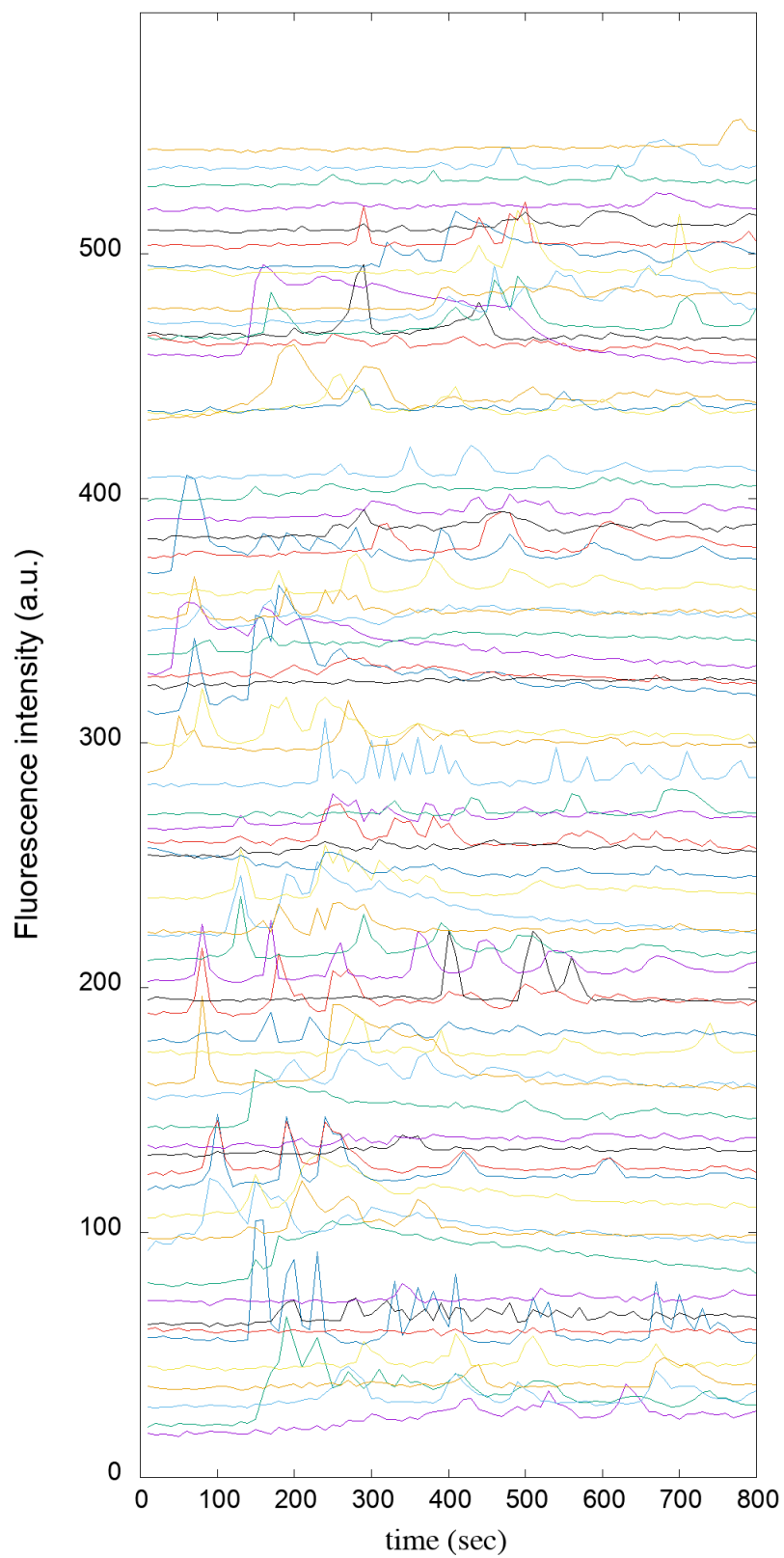
Pertanto, nei nostri esperimenti, per verificare le ipotesi su riportate, è stato

testato il blocco delle attività del mGluR5 attraverso l'uso di un inibitore altamente selettivo, la 2-Metil-6(fenilatinil)piridina (MPEP), alla concentrazione di  $50\mu\text{M}$ .

I campioni di cellule astrocitarie umane, analizzate in condizioni basali, mostrano un valore medio degli spike di  $\text{Ca}^{2+}$  al minuto uguale a 0.58 leggermente superiore al valore medio di spike di  $\text{Ca}^{2+}$  al minuto delle stesse cellule trattate con l'inibitore MPEP, il cui valore è uguale a 0.51 come si può evincere dalla allegata tabella di dati e dalle immagini riportate.

<b>Astrociti umani</b>				
Tipo	t osservazione	N. ROI	Spike totali	Media spike al min.
1 Basale	790 (s)	68	529	0.59
2 Basale	800 (s)	59	519	0.66
3 Basale	800 (s)	60	507	0.63
4 Basale	790 (s)	128	752	0.45
6 MPEP inibitore	500 (s)	92	393	0.51





**Figura 7.1:** *Dinamica del  $Ca^{2+}$  in astrociti umani immortalizzati in condizioni basali*

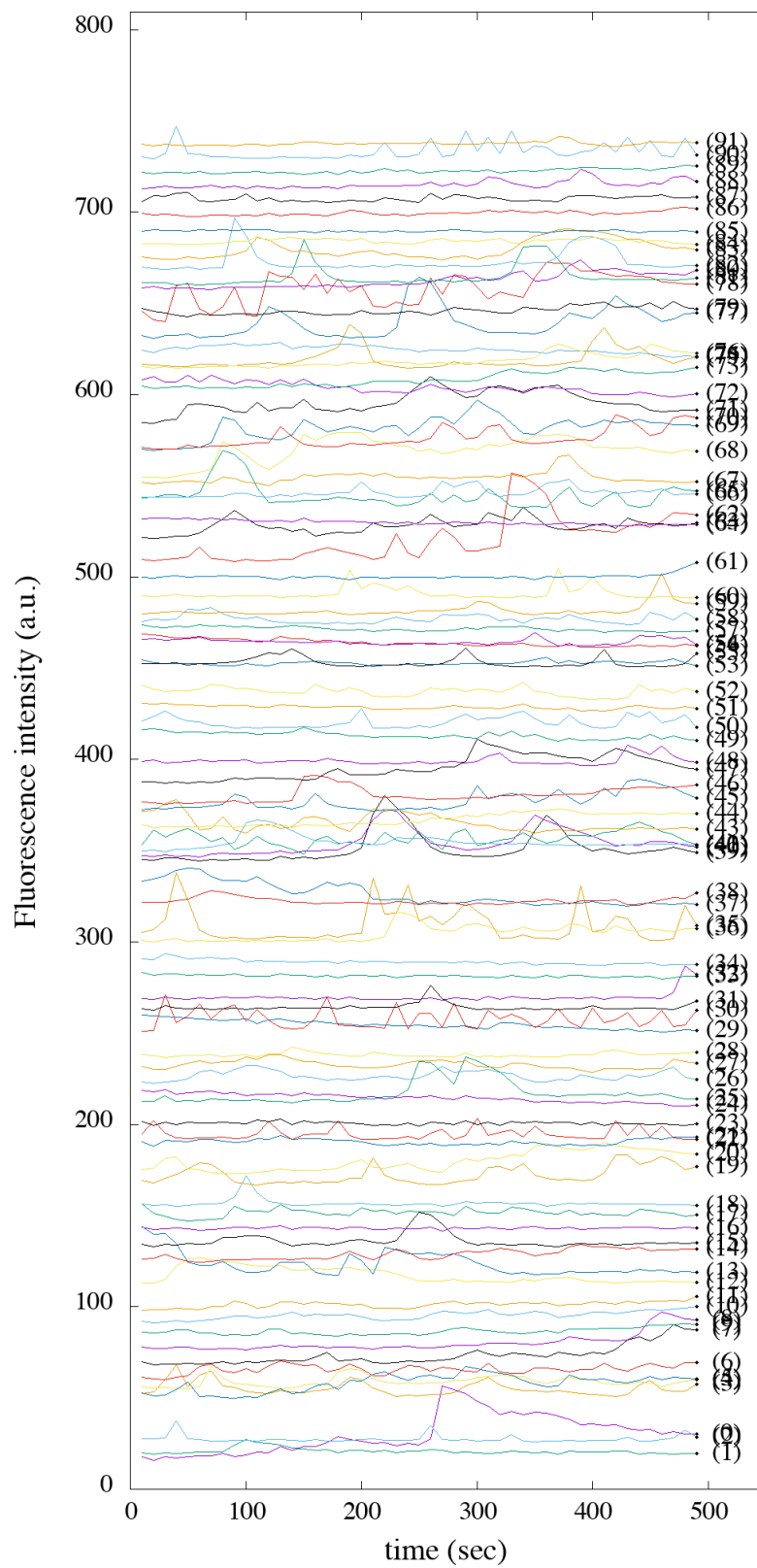


Figura 7.2: Dinamica del  $Ca^{2+}$  in astrociti umani immortalizzati trattati con l'inibitore MPEP

### 7.1.2 Astrociti murini

La sindrome dell'X fragile (FXS) è la principale causa monogenica di disabilità intellettiva e di disturbi dello spettro autistico. Da studi concernenti i meccanismi molecolari alla base della FXS, emerge sempre più chiara l'evidenza che le perturbazioni della segnalazione gliale sono ampiamente associate alla patologia neurologica.

L'oggetto del presente studio è stato quello di valutare se l'attivazione del recettore mGlu5 possa indurre un incremento nella dinamica intracellulare del  $Ca^{2+}$  astrocitario in cellule di topo affette dalla sindrome dell'X fragile, attraverso l'applicazione dell'agonista 3,5-diidrossifelinglicina (DHPG).

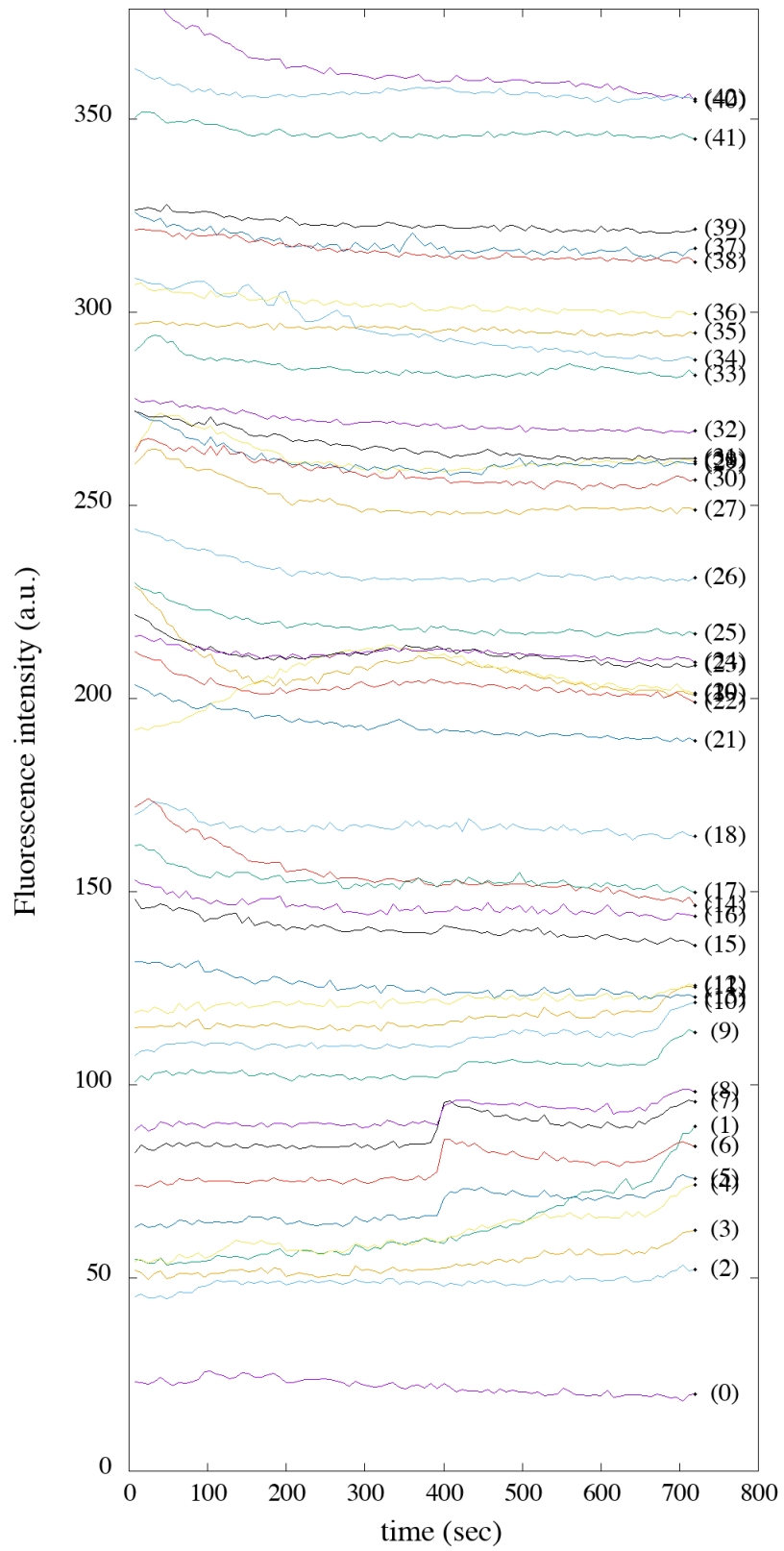
A tal fine, sono state messe a confronto cellule astrogliali di topo Wild-type e di topo Knock-out. Negli astrociti di tipo Wild-type l'applicazione di DHPG sembrerebbe avere una lieve alterazione delle proprietà intrinseche della dinamica del  $Ca^{2+}$  astrocitario infatti, come si può evincere dalla tabella dati riportata, il valore medio degli spike di  $Ca^{2+}$  al minuto per le cellule in condizioni basale è uguale a 0.11, mentre il valore medio degli spike di  $Ca^{2+}$  al minuto delle stesse cellule trattate con l'agonista DHPG risulta essere uguale a 0.15. Ciò suggerirebbe un minimo effetto dell'agonista DHPG in cellule di topi sani, coerentemente con quanto accertato da Umpierre et al[126].

Diversamente, sembrerebbe che la dinamica del  $Ca^{2+}$  sia riattivata dall'agonista DHPG in cellule astrogliali di topo Knock-out per l'X fragile.

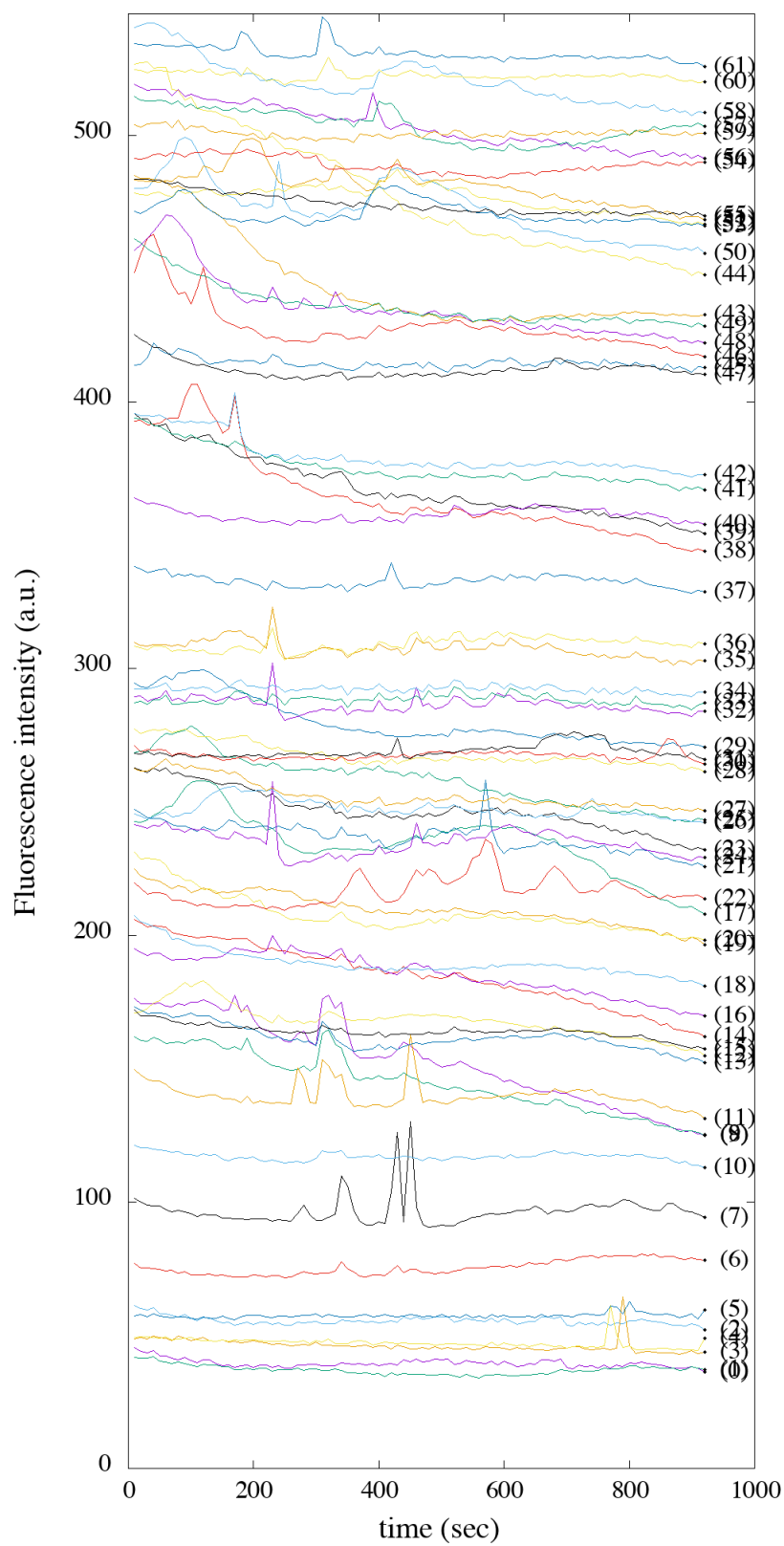
Dai dati riportati in tabella si può evincere che la dinamica del  $Ca^{2+}$  degli astrociti di topo KO in condizioni basali passa da un valore medio di spike al minuto di 0,04 ad un valore di 0,15.

## Astrociti murini

Tipo	t osservazione	N. ROI	Spike totali	Media spike al min.
1 WT Basale	410 (s)	70	62	0.13
2 WT Basale	728 (s)	43	54	0.10
3 WT (3,5-DHPG)	450 (s)	56	74	0.18
4 WT (3,5-DHPG)	930 (s)	62	111	0.12
1 KO Basale	670 (s)	68	32	0.04
2 KO (3,5-DHPG)	225 (s)	55	31	0.15

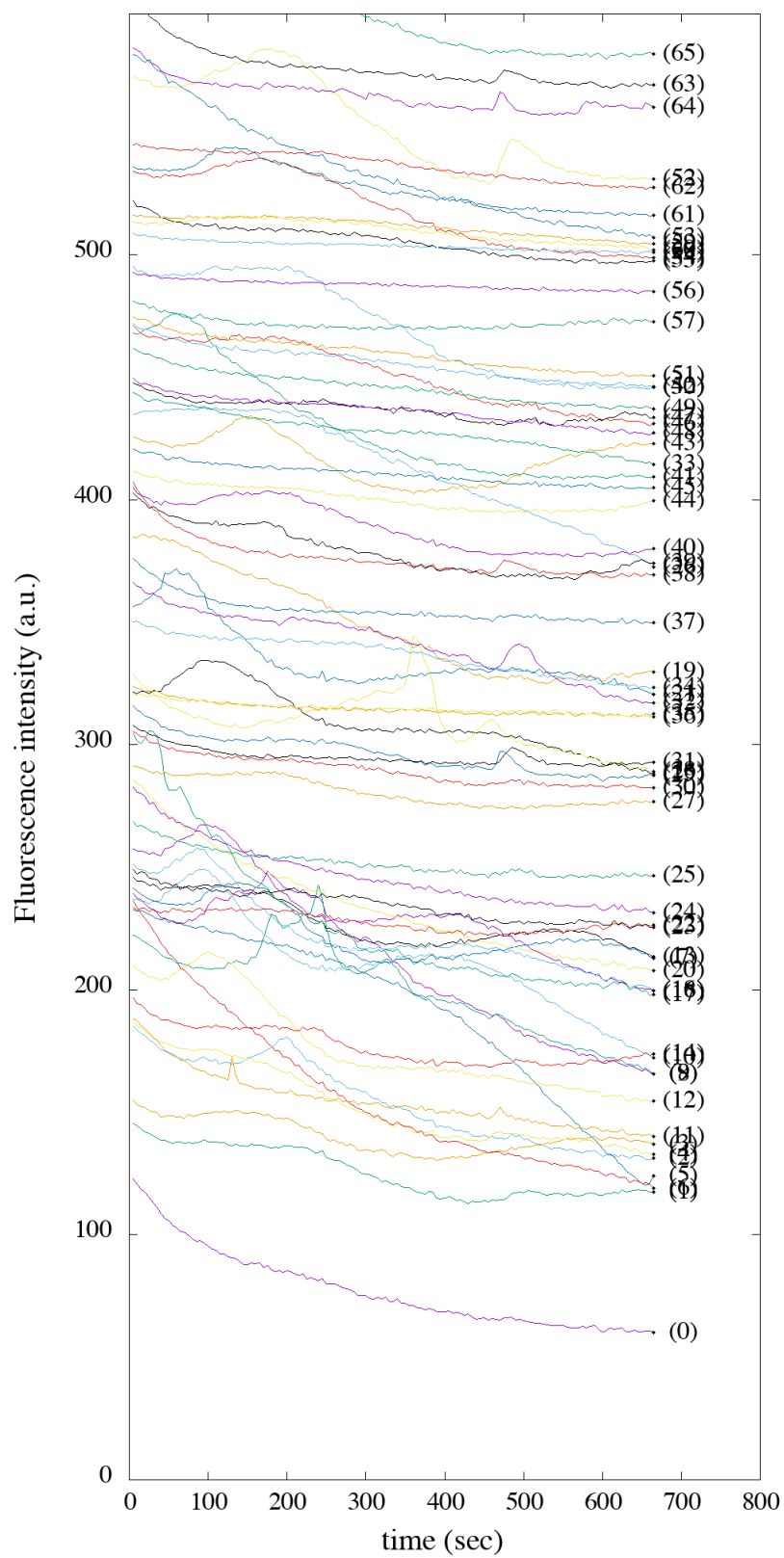


**Figura 7.3:** *Dinamica del  $Ca^{2+}$  in astrociti murini Wild-Type in condizioni basali.*



**Figura 7.4:** *Dinamica del  $Ca^{2+}$  in astrociti murini Wild-type trattati con l'agonista DHPG.*





**Figura 7.6:** *Dinamica del  $Ca^{2+}$  in astrociti murini Knock-out trattati con l'agonista DHPG.*



## 7.2 Conclusioni

Lo studio condotto dimostra chiaramente che la metodica impiegata e lo strumento appositamente adattato allo scopo, rispondono positivamente alla rilevazione e alla successiva valutazione dei cambiamenti relativi degli ioni  $Ca^{2+}$  intracellulari in cellule astrocitarie, sebbene il numero di campioni a disposizione non sia risultato sufficiente per poter accertare che il signaling mGlu5 sia bloccato dall'antagonista MPEP in cellule astrocitarie umane e sia attivato dall'agonista DHPG in topi Knock-out per l'X fragile.

Sulla stessa linea direttrice, si intendono estendere gli studi su un numero ancora più rappresentativo di cellule astrocitarie al fine di suffragare le evidenze ottenute grazie a un campione statistico più popoloso. Inoltre, l'applicazione dell'antagonista specifico MPEP su cellule di topo Knock-out per l'X fragile precedentemente trattate con l'agonista DHPG può rivelarsi utile per valutare se l'attività del  $Ca^{2+}$  intracellulare persista anche dopo aver sospeso il signaling del mGlu5.



# Appendice A

## Software Python

```
import matplotlib.pyplot as plt import numpy as np
from scipy.integrate import odeint
# setup parameters and state variables v_1 = 6.0 #
v_2 = 0.11 #
v_3 = 0.9 # 0.9*10**-6
C_0 = 2 # 2*10**-6
c_1 = 0.185
K_3 = 0.1 #M 0.1*10**-6
d_1 = 0.13 # 0.13*10**-6
d_2 = 1.049 # 1.049*10**-6 d_3 = 0.9434 # 0.9434*10**-6 d_5 =
..... 0.08234 # 0.08234*10**-6 a_2 = 0.2 # 0.2*10**-6
I = 0.355 # 0.355*10**-6
#print(type(c_1))
#print(I)
Q_2 = ((I + d_1)/(I + d_3))*d_2 #print(Q_2)
def m_inf(val1):
return (I/(I + d_1))*(val1/(val1 + d_5))
def h_inf(val2):
return (Q_2/(Q_2 + val2))
```

```

def tau_h(val3):
return (1.0)/(a_2*(Q_2 + val3))
def J_leak(val4):
return v_2*(C_0 - (1.0 + c_1)*val4)
def J_pump(val5):
return v_3*(val5**2)/((K_3)**2 + val5**2)
def J_chan(val6, val7):
return v_1*(m_inf(val6)**3)*(val7**3)*(C_0 - (1.0 + c_1)*val6) #dipendenza_
da C, h #print(m_inf(1.0))
#print(J_chan(1.0,1.0))
#def Ca(C,t):
#    dCdt = J_leak(C) + J_pump(C) + J_chan(C)
# return dCdt
def dP_dt(P, tempo):
return [J_chan(P[0], P[1]) + J_leak(P[0]) + J_pump(P[0]),_
(h_inf(P[0])-P[1])/tau_h(P[0])]
ts = np.linspace(0.0,50.0) #print(ts)
P0 = [0.0,0.0] # 0.0*10**-6 Ps = odeint(dP_dt, P0, ts) Ca_conc = Ps[:,0]
h = Ps[:,1]
print(Ca_conc)
print(h)
# plot results
plt.plot(h, Ca_conc) plt.xlabel("IP3") plt.ylabel("Ca2+")
plt.legend()
plt.savefig('LIF.png', dpi=300)
plt.show()

```

# Appendice A

## Gnuplot script

Script personalizzato per l'estrazione dei dati di intensità di ogni cellula e la realizzazione di grafici di intensità in funzione del tempo.

```
reset
set term X11
print 'Inserire nome file csv senza estensione: ..... '
filename = system("read filename; echo $filename")
print 'Estraggo da '.filename.'.csv'
print 'Inserire posizione prima colonna da plottare: ...'
start = system("read start; echo $start")
print 'Inserire intervallo ripetizione colonne da plottare: ...'
step = system("read step; echo $step")
print 'Inserire time lapse in secondi: ...'
interval = system("read interval; echo $interval")
file_in= filename.'.csv'
file_out= filename.'.dat'
set key box autotitle columnhead
unset key
set datafile separator comma
stat file_in noout
```

```

numos= STATS_records          # number of Steps
numor= STATS_columns          # number of ROI + 1
p for [i=start:numor:step] file_in us (($1-1)*interval):i w l
set table
set out file_out
p for [i=start:numor:step] file_in us (($1-1)*interval):i w l
set out
unset table
set xlabel 'time (sec)'
set ylabel 'Fluorescence intensity (a.u.)'
Nnumor=(numor-1)/step # number of extracted ROI
set datafile separator whitespace
last_index = numos-2
vskip=8
set xrange[0:last_index*interval*1.1]
set yrange[0 :vskip*Nnumor*1.1]
plot for [k=0:(Nnumor-1)] file_out i k us ($1):($2+k*vskip) w l lw 1.5, for [k=0:(Nnumor-1)
set term png size 1024, 2048
set out filename.'.png'
plot for [k=0:(Nnumor-1)] file_out i k us ($1):($2+k*vskip) w l lw 1.5, for [k=0:(Nnumor-1)
set term x11
set out

```

### Script personalizzato per la ricerca degli spike di $Ca^{2+}$

```

### a simple gnuplot peak-finder
# requires gnuplot >=5.2
reset session
set term x11
#set terminal png enhanced nottransparent truecolor font arial 9 size 800,1024
#FILE = "Results.dat"
print 'Inserire nome file (block data): ..... '

```

```

FILE = system("read FILE; echo $FILE")
print 'Inserire prominenza minima: ..... '
soglia = system("read soglia; echo $soglia")
print 'Estraggo da '.FILE
set datafile separator whitespace
stat FILE noout
numor= STATS_blocks # number of block  ex ROI
#unset border
#unset key
set yzeroaxis
set xzeroaxis
set xtics  axis
unset ytics
do for [roi=0:numor-1] {
#           print roi
#           print numor
#           print FILE
set table $Data
plot FILE i roi with table
unset table
ColX=1
ColY=2
set datafile separator whitespace
# extract all peaks
y2=y1=NaN
set print $Peaks
do for [i=2:|$Data|-1] {
if ( word($Data[i-1],ColY)<word($Data[i],ColY) && word($Data[i+1],ColY)<word($Data[i],ColY)
{ print sprintf("%d %s %s", i, word($Data[i],ColX), word($Data[i],ColY)) }
}
set print

```

```

# determine prominence
set print $PeakInfo
do for [i=1:|$Peaks|] {
PeakIndex = int(word($Peaks[i],1))
PeakX = real(word($Data[PeakIndex],ColX))
PeakY = real(word($Data[PeakIndex],ColY))
MinY1 = PeakY
do for [j=PeakIndex+1:|$Data|] { # search for higher peak to the right
if ( word($Data[j],ColY) > PeakY ) { break }
else { MinY1 = word($Data[j],ColY) < MinY1 ? word($Data[j],ColY) : MinY1 }
}
MinY2 = PeakY
do for [j=PeakIndex-1:1:-1] { # search for higher peak to the left
if ( word($Data[j],ColY) > PeakY ) { break }
else { MinY2 = word($Data[j],ColY) < MinY2 ? word($Data[j],ColY) : MinY2 }
}
Prominence = MinY1 > MinY2 ? PeakY-MinY1 : PeakY-MinY2
NormalizedProminence = 100.*Prominence/PeakY
print sprintf("%2d %6.1f %6.1f %6.2f", i, PeakX, PeakY, NormalizedProminence )
}

print ' ' # Extraline to work as block file for gnuplot
set print FILE."_Peaks.dat" append
print $PeakInfo
set print
set auto
set yrange[:]
Threshold = soglia
# set label 1 at graph 0.05, 0.9 sprintf("Threshold: %g",Threshold)
#set origin 0.02 ,(roi-2.)/numor+0.02
#set size 1 , 1./(numor-1)
plot $Data u 1:2 w l lc rgb "red" not, \

```



```
$PeakInfo u ($4>Threshold?$2:NaN):3 w p pt 7 lc rgb "blue" not, \  
$PeakInfo u ($4>Threshold?$2:NaN):3:2 w labels offset 0,0.8 not, \  
$PeakInfo u ($4>Threshold?$2:NaN):3 w impulses lc rgb "black" not  
pause -1 "Click to continue"  
  
#unset xtics  
  
### end of code  
  
}  
  
unset multiplot
```



# Bibliografia

- [1] Andrea Volterra and Jacopo Meldolesi. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(8):626–640, 2005.
- [2] Philip G Haydon and Giorgio Carmignoto. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews*, 86(3):1009–1031, 2006.
- [3] Laura E Clarke and Ben A Barres. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5):311–321, 2013.
- [4] Baljit S Khakh and Ken D McCarthy. Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4):a020404, 2015.
- [5] Baljit S Khakh and Michael V Sofroniew. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature neuroscience*, 18(7):942–952, 2015.
- [6] Alexei Verkhratsky and Maiken Nedergaard. Physiology of astroglia. *Physiological reviews*, 98(1):239–389, 2018.
- [7] Alexey Semyanov, Christian Henneberger, and Amit Agarwal. Making sense of astrocytic calcium signals—from acquisition to interpretation. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(10):551–564, 2020.
- [8] Paulo Kofuji and Alfonso Araque. G-protein-coupled receptors in astrocyte–neuron communication. *Neuroscience*, 456:71–84, 2021.

- [9] Mucke Eddleston and L Mucke. Molecular profile of reactive astrocytes—implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1):15–36, 1993.
- [10] Alexei Verkhratsky, Markel Olabarria, Harun N Noristani, Chia-Yu Yeh, and Jose Julio Rodriguez. Astrocytes in alzheimer’s disease. *Neurotherapeutics*, 7(4):399–412, 2010.
- [11] Phillip M Rappold and Kim Tieu. Astrocytes and therapeutics for parkinson’s disease. *Neurotherapeutics*, 7(4):413–423, 2010.
- [12] A Madinier, N Bertrand, M Rodier, A Quirié, Claude Mossiat, A Prigent-Tessier, Christine Marie, and Philippe Garnier. Ipsilateral versus contralateral spontaneous post-stroke neuroplastic changes: involvement of bdnf? *Neuroscience*, 231:169–181, 2013.
- [13] Tore Eid, Anne Williamson, Tih-Shih W Lee, Ognen A Petroff, and Nihal C De Lamerolle. Glutamate and astrocytes—key players in human mesial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia*, 49:42–52, 2008.
- [14] Lucia Pasti, Andrea Volterra, Tullio Pozzan, and Giorgio Carmignoto. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience*, 17(20):7817–7830, 1997.
- [15] Maurizio De Pittà, Mati Goldberg, Vladislav Volman, Hugues Berry, and Eshel Ben-Jacob. Glutamate regulation of calcium and ip3 oscillating and pulsating dynamics in astrocytes. *Journal of biological physics*, 35(4):383–411, 2009.
- [16] Kohei J Sekiguchi, Pavel Shekhtmeyster, Katharina Merten, Alexander Arena, Daniela Cook, Elizabeth Hoffman, Alexander Ngo, and Axel Nimmerjahn. Imaging large-scale cellular activity in spinal cord of freely behaving mice. *Nature communications*, 7(1):1–13, 2016.
- [17] Martin R McAinsh, Colin Brownlee, and Alistair M Hetherington. Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 100(1):16–29, 1997.

- [18] Luis Aguilera, Frank T Bergmann, Giovanni Dalmaso, Sinan Elmas, Tobias Elsässer, Ruth Großholz, Pascal Holzheu, Priyata Kalra, Ursula Kummer, Sven Sahle, et al. Robustness of frequency vs. amplitude coding of calcium oscillations during changing temperatures. *Biophysical chemistry*, 245:17–24, 2019.
- [19] Christine R Rose and Claudia Karus. Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia*, 61(8):1191–1205, 2013.
- [20] Rogier Min, Mirko Santello, and Thomas Nevian. The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. *Frontiers in computational neuroscience*, 6:93, 2012.
- [21] Frederico AC Azevedo, Ludmila RB Carvalho, Lea T Grinberg, José Marcelo Farfel, Renata EL Ferretti, Renata EP Leite, Wilson Jacob Filho, Roberto Lent, and Suzana Herculano-Houzel. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513(5):532–541, 2009.
- [22] Jami Bahney and Christopher S von Bartheld. Validation of the isotropic fractionator: comparison with unbiased stereology and dna extraction for quantification of glial cells. *Journal of neuroscience methods*, 222:165–174, 2014.
- [23] Rudolf Virchow. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre: zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institute zu Berlin*, volume 1. Hirschwald, 1859.
- [24] Camillo Golgi. Sulla sostanza grigia del cervello. *Gazetta Medica Italiana*, 33:244–246, 1873.
- [25] Santiago Ramón y Cajal et al. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados: estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos. volumen i. 1899.

- [26] Ana Paula Bergamo Araujo, Raul Carpi-Santos, and Flávia Carvalho Alcantara Gomes. The role of astrocytes in the development of the cerebellum. *The Cerebellum*, 18(6):1017–1035, 2019.
- [27] Alan L Hodgkin, Andrew F Huxley, and Bernard Katz. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of loligo. *The Journal of physiology*, 116(4):424, 1952.
- [28] Gertrudis Perea, Marta Navarrete, and Alfonso Araque. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, 32(8):421–431, 2009.
- [29] Alfonso Araque, Vladimir Parpura, Rita P Sanzgiri, and Philip G Haydon. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22(5):208–215, 1999.
- [30] Mirko Santello, Corrado Calì, and Paola Bezzi. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Synaptic Plasticity*, pages 307–331, 2012.
- [31] S Ramon y Cajal. Sobre las fibras nerviosas de la capa molecular del cerebelo, rev. trimestr, 1888.
- [32] Mihály Lenhossék. *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen*. Fischer, 1893.
- [33] Carl Ludwig Schleich. *Zur infiltrationsanästhesie*. Springer, 1894.
- [34] Santiago Ramón y Cajal. *Algunas conjeturas sobre el mecanismo anatómico de la ideación, asociación y atención*. 1895.
- [35] F de Castro. Rapport n° 1 aspects anatomiques de la transmission synaptique ganglionnaire chez les mammifères. *Archives Internationales de Physiologie*, 59(4):479–513, 1951.
- [36] E Lugaro. Sulle funzioni della nevroglia. *Riv Pat Nerv Ment*, 12:225–233, 1907.
- [37] Steven Mennerick and Charles F Zorumski. Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature*, 368(6466):59–62, 1994.

- [38] Walter Hild, JJ Chang, and Ichiji Tasaki. Electrical responses of astrocytic glia from the mammalian central nervous system cultivated in vitro. *Experientia*, 14(6):220–221, 1958.
- [39] Leif Hertz. Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal–neuroglial–neuronal impulse transmission system. *Nature*, 206(4989):1091–1094, 1965.
- [40] MW Brightman and TS2107650 Reese. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of cell biology*, 40(3):648–677, 1969.
- [41] Richard S Morrison and Jean De Vellis. Growth of purified astrocytes in a chemically defined medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11):7205–7209, 1981.
- [42] CL Bowman and HK Kimelberg. Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature*, 311(5987):656–659, 1984.
- [43] Ann H Cornell-Bell, Steven M Finkbeiner, Mark S Cooper, and Stephen J Smith. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, 247(4941):470–473, 1990.
- [44] Maiken Nedergaard. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*, 263(5154):1768–1771, 1994.
- [45] Vladimir Parpura, Trent A Basarsky, Fang Liu, Ksenija Jeftinija, Srdija Jeftinija, and Philip G Haydon. Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature*, 369(6483):744–747, 1994.
- [46] Robert Galambos. A glia-neural theory of brain function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(1):129–136, 1961.
- [47] W Michael Caudle, Jason R Richardson, Kristin C Delea, Thomas S Guillot, Minzheng Wang, Kurt D Pennell, and Gary W Miller. Polychlorinated biphenyl–induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to parkinson’s disease–associated dopamine toxicity. *Toxicological Sciences*, 92(2):490–499, 2006.
- [48] Alfredo Pereira Jr and Fabio Augusto Furlan. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. *Progress in neurobiology*, 92(3):405–420, 2010.

- [49] Samuel Bellini-Leite and Alfredo Jr Pereira. Is global workspace a cartesian theater? how the neuro-astroglial interaction model solves conceptual issues. *Journal of Cognitive Science*, 14(4):335–360, 2013.
- [50] Claire Robertson, David D Tran, and Steven C George. Concise review: maturation phases of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem cells*, 31(5):829–837, 2013.
- [51] Nathalie Rouach, Annette Koulakoff, and Christian Giaume. Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks. *Neurochemistry international*, 45(2-3):265–272, 2004.
- [52] Sergei A Kirov, Karin E Sorra, and Kristen M Harris. Slices have more synapses than perfusion-fixed hippocampus from both young and mature rats. *Journal of Neuroscience*, 19(8):2876–2886, 1999.
- [53] Eric A Bushong, Maryann E Martone, and Mark H Ellisman. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(2):73–86, 2004.
- [54] Costantino Iadecola and Maiken Nedergaard. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature neuroscience*, 10(11):1369–1376, 2007.
- [55] Alexej Verkhratsky and Christian Steinhäuser. Ion channels in glial cells. *Brain research reviews*, 32(2-3):380–412, 2000.
- [56] Ana Gadea and Ana María López-Colomé. Glial transporters for glutamate, glycine, and gaba: Ii. gaba transporters. *Journal of neuroscience research*, 63(6):461–468, 2001.
- [57] Mireille Bélanger and Pierre J Magistretti. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues in clinical neuroscience*, 2022.
- [58] Knut Holthoff and Otto W Witte. Directed spatial potassium redistribution in rat neocortex. *Glia*, 29(3):288–292, 2000.



- [59] Raimondo D'Ambrosio, David S Gordon, and H Richard Winn. Differential role of kir channel and na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup>-pump in the regulation of extracellular k<sup>+</sup> in rat hippocampus. *Journal of neurophysiology*, 87(1):87–102, 2002.
- [60] Paulo Kofuji and EA2322935 Newman. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4):1043–1054, 2004.
- [61] Mathilde Gavillet, Igor Allaman, and Pierre J Magistretti. Modulation of astrocytic metabolic phenotype by proinflammatory cytokines. *Glia*, 56(9):975–989, 2008.
- [62] John X Wilson. Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 75(10-11):1149–1163, 1997.
- [63] Nancy Ann Oberheim, Takahiro Takano, Xiaoning Han, Wei He, Jane HC Lin, Fushun Wang, Qiwu Xu, Jeffrey D Wyatt, Webster Pilcher, Jeffrey G Ojemann, et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 29(10):3276–3287, 2009.
- [64] James E Vaughn and Daniel C Pease. Electron microscopy of classically stained astrocytes. *Journal of Comparative Neurology*, 131(2):143–153, 1967.
- [65] A Bignami, LF Eng, D Dahl, and CT Uyeda. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain research*, 43(2):429–435, 1972.
- [66] Marc R Freeman. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*, 330(6005):774–778, 2010.
- [67] Thomas Voigt. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *Journal of comparative neurology*, 289(1):74–88, 1989.
- [68] Suzana Herculano-Houzel. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9):1377–1391, 2014.
- [69] Marta Navarrete, Gertrudis Perea, Laura Maglio, Jesús Pastor, Rafael García de Sola, and Alfonso Araque. Astrocyte calcium signal and gliotransmission in human brain tissue. *Cerebral cortex*, 23(5):1240–1246, 2013.

- [70] Flora Vasile, Elena Dossi, and Nathalie Rouach. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Structure and Function*, 222(5), 2017.
- [71] Peter Bedner, Ronald Jabs, and Christian Steinhäuser. Properties of human astrocytes and ng2 glia. *Glia*, 68(4):756–767, 2020.
- [72] Anca M Paşca, Steven A Sloan, Laura E Clarke, Yuan Tian, Christopher D Mankinson, Nina Huber, Chul Hoon Kim, Jin-Young Park, Nancy A O’rourke, Khoa D Nguyen, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3d culture. *Nature methods*, 12(7):671–678, 2015.
- [73] Marita Grønning Hansen, Daniel Tornero, Isaac Canals, Henrik Ahlenius, and Zaal Kokaia. In vitro functional characterization of human neurons and astrocytes using calcium imaging and electrophysiology. In *Neural Stem Cells*, pages 73–88. Springer, 2019.
- [74] Joshua E Burda and Michael V Sofroniew. Reactive gliosis and the multicellular response to cns damage and disease. *Neuron*, 81(2):229–248, 2014.
- [75] Michael V Sofroniew. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, 32(12):638–647, 2009.
- [76] Susan F Volman, Stephan Lammel, Elyssa B Margolis, Yunbok Kim, Jocelyn M Richard, Mitchell F Roitman, and Mary Kay Lobo. New insights into the specificity and plasticity of reward and aversion encoding in the mesolimbic system. *Journal of Neuroscience*, 33(45):17569–17576, 2013.
- [77] Joseph T Neary, Yuan Kang, Karen A Willoughby, and Earl F Ellis. Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular atp and p2 purinergic receptors. *Journal of Neuroscience*, 23(6):2348–2356, 2003.
- [78] BA Rzigalinski, JT Weber, KA Willoughby, and EF Ellis. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. *Journal of neurochemistry*, 70(6):2377–2385, 1998.
- [79] Syed M Ahmed, Beverly A Rzigalinski, Karen A Willoughby, Heather A Sitterding, and Earl F Ellis. Stretch-induced injury alters mitochondrial membrane potential

and cellular atp in cultured astrocytes and neurons. *Journal of neurochemistry*, 74(5):1951–1960, 2000.

- [80] Hosuk Sean Lee, Andrea Ghetti, António Pinto-Duarte, Xin Wang, Gustavo Dzieczapolski, Francesco Galimi, Salvador Huitron-Resendiz, Juan C Piña-Crespo, Amanda J Roberts, Inder M Verma, et al. Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(32):E3343–E3352, 2014.
- [81] David R Cotter, Carmine M Pariante, and Ian P Everall. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain research bulletin*, 55(5):585–595, 2001.
- [82] Francois Grenier, Igor Timofeev, and Mircea Steriade. Focal synchronization of ripples (80–200 hz) in neocortex and their neuronal correlates. *Journal of neurophysiology*, 86(4):1884–1898, 2001.
- [83] Vladimir Parpura and Philip G Haydon. Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15):8629–8634, 2000.
- [84] Suhita Nadkarni and Peter Jung. Spontaneous oscillations of dressed neurons: a new mechanism for epilepsy? *Physical review letters*, 91(26):268101, 2003.
- [85] Alexander N Silchenko and Peter A Tass. Computational modeling of paroxysmal depolarization shifts in neurons induced by the glutamate release from astrocytes. *Biological Cybernetics*, 98(1):61–74, 2008.
- [86] Marta Gómez-Gonzalo, Gabriele Losi, Angela Chiavegato, Micaela Zonta, Mario Cammarota, Marco Brondi, Francesco Vetri, Laura Uva, Tullio Pozzan, Marco de Curtis, et al. An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold. *PLoS biology*, 8(4):e1000352, 2010.
- [87] Daniela Rossi and Andrea Volterra. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain research bulletin*, 80(4-5):224–232, 2009.

- [88] Kazunori Kanemaru, Jun Kubota, Hiroshi Sekiya, Kenzo Hirose, Yohei Okubo, and Masamitsu Iino. Calcium-dependent n-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28):11612–11617, 2013.
- [89] Alvaro Pascual-Leone, Amir Amedi, Felipe Fregni, and Lotfi B Merabet. The plastic human brain cortex. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28:377–401, 2005.
- [90] Yo Otsu, Kiri Couchman, Declan G Lyons, Mayeul Collot, Amit Agarwal, Jean-Maurice Mallet, Frank W Pfrieder, Dwight E Bergles, and Serge Charpak. Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nature neuroscience*, 18(2):210–218, 2015.
- [91] Jillian L Stobart, Kim David Ferrari, Matthew JP Barrett, Chaim Glück, Michael J Stobart, Marc Zuend, and Bruno Weber. Cortical circuit activity evokes rapid astrocyte calcium signals on a similar timescale to neurons. *Neuron*, 98(4):726–735, 2018.
- [92] Erika Bindocci, Iaroslav Savtchouk, Nicolas Liaudet, Denise Becker, Giovanni Carriero, and Andrea Volterra. Three-dimensional  $ca^{2+}$  imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*, 356(6339):eaai8185, 2017.
- [93] Amit Agarwal, Pei-Hsun Wu, Ethan G Hughes, Masahiro Fukaya, Max A Tischfield, Abraham J Langseth, Denis Wirtz, and Dwight E Bergles. Transient opening of the mitochondrial permeability transition pore induces microdomain calcium transients in astrocyte processes. *Neuron*, 93(3):587–605, 2017.
- [94] RF Irvine, AJ Letcher, JP Heslop, and MJ Berridge. The inositol tris/tetrakisphosphate pathway—demonstration of ins (1, 4, 5) p3 3-kinase activity in animal tissues. *Nature*, 320(6063):631–634, 1986.
- [95] Albert Goldbeter, Geneviève Dupont, and Michael J Berridge. Minimal model for signal-induced  $ca^{2+}$  oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(4):1461–1465, 1990.

- [96] Gary W De Young and Joel Keizer. A single-pool inositol 1, 4, 5-trisphosphate-receptor-based model for agonist-stimulated oscillations in  $ca^{2+}$  concentration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20):9895–9899, 1992.
- [97] Michael J Berridge and Robin F Irvine. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341(6239):197–205, 1989.
- [98] Bernard Mouillac, Marie-Noëlle Balestre, and Gilles Guillon. Positive feedback regulation of phospholipase c by vasopressin-induced calcium mobilization in wrk1 cells. *Cellular signalling*, 2(5):497–507, 1990.
- [99] Alan V Smrcka, John R Hepler, Kendall O Brown, and Paul C Sternweis. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase c activity by purified gq. *Science*, 251(4995):804–807, 1991.
- [100] Stephen J Taylor and John H Exton. Guanine-nucleotide and hormone regulation of polyphosphoinositide phospholipase c activity of rat liver plasma membranes. bivalent-cation and phospholipid requirements. *Biochemical Journal*, 248(3):791–799, 1987.
- [101] Yue-Xian Li and John Rinzel. Equations for inositol 3 receptor-mediated  $[ca^{2+}]_i$  oscillations derived from a detailed kinetic model: a hodgkin-huxley like formalism. *Journal of theoretical Biology*, 166(4):461–473, 1994.
- [102] Alan L Hodgkin and Andrew F Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*, 117(4):500, 1952.
- [103] Max R Bennett, Les Farnell, and William G Gibson. A quantitative model of cortical spreading depression due to purinergic and gap-junction transmission in astrocyte networks. *Biophysical journal*, 95(12):5648–5660, 2008.
- [104] Alexander Skupin, Helmut Kettenmann, and Martin Falcke. Calcium signals driven by single channel noise. *PLoS computational biology*, 6(8):e1000870, 2010.
- [105] J Riera, R Hatanaka, T Ozaki, and R Kawashima. Modeling the spontaneous  $ca^{2+}$  oscillations in astrocytes: Inconsistencies and usefulness. *Journal of integrative neuroscience*, 10(04):439–473, 2011.

- [106] Bankim Subhash Chander and V Srinivasa Chakravarthy. A computational model of neuro-glio-vascular loop interactions. *PloS one*, 7(11):e48802, 2012.
- [107] Casey O Diekman, Christopher P Fall, James D Lechleiter, and David Terman. Modeling the neuroprotective role of enhanced astrocyte mitochondrial metabolism during stroke. *Biophysical journal*, 104(8):1752–1763, 2013.
- [108] Maxim Lavrentovich and Sheryl Hemkin. A mathematical model of spontaneous calcium (ii) oscillations in astrocytes. *Journal of Theoretical Biology*, 251(4):553–560, 2008.
- [109] Shuai Zeng, Bing Li, Shaoqun Zeng, and Shangbin Chen. Simulation of spontaneous  $ca^{2+}$  oscillations in astrocytes mediated by voltage-gated calcium channels. *Biophysical journal*, 97(9):2429–2437, 2009.
- [110] Eeva Toivari, Tiina Manninen, Amit K Nahata, Tuula O Jalonen, and Marja-Leena Linne. Effects of transmitters and amyloid-beta peptide on calcium signals in rat cortical astrocytes: Fura-2am measurements and stochastic model simulations. *PloS one*, 6(3):e17914, 2011.
- [111] Thomas Höfer, Laurent Venance, and Christian Giaume. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *Journal of Neuroscience*, 22(12):4850–4859, 2002.
- [112] Alireza Atri, Jeff Amundson, David Clapham, and James Sneyd. A single-pool model for intracellular calcium oscillations and waves in the xenopus laevis oocyte. *Biophysical Journal*, 65(4):1727–1739, 1993.
- [113] James D Lechleiter and David E Clapham. Molecular mechanisms of intracellular calcium excitability in *x. laevis* oocytes. *Cell*, 69(2):283–294, 1992.
- [114] Elizabeth A Finch, Timothy J Turner, and Stanley M Goldin. Calcium as a coagonist of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced calcium release. *Science*, 252(5004):443–446, 1991.
- [115] I Parker and I Ivorra. Inhibition by  $ca^{2+}$  of inositol trisphosphate-mediated  $ca^{2+}$  liberation: a possible mechanism for oscillatory release of  $ca^{2+}$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(1):260–264, 1990.

- [116] Masamitsu Iino and Makoto Endo. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced  $ca^{2+}$  release. *Nature*, 360(6399):76–78, 1992.
- [117] Steven Girard and David Clapham. Acceleration of intracellular calcium waves in xenopus oocytes by calcium influx. *Science*, 260(5105):229–232, 1993.
- [118] Vladimir Parpura, Eliana Scemes, and David C Spray. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction “hemichannels”, purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochemistry international*, 45(2-3):259–264, 2004.
- [119] Giorgio Carmignoto. Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Progress in neurobiology*, 62(6):561–581, 2000.
- [120] Michael J Berridge. Calcium microdomains: organization and function. *Cell calcium*, 40(5-6):405–412, 2006.
- [121] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7):676–682, 2012.
- [122] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7):671–675, 2012.
- [123] Stanley R Sternberg. Biomedical image processing. *Computer*, 16(01):22–34, 1983.
- [124] Zhaohui Cai, Gary P Schools, and Harold K Kimelberg. Metabotropic glutamate receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes: developmental changes of *mglur5* mrna and functional expression. *Glia*, 29(1):70–80, 2000.
- [125] Marcello D’Ascenzo, Tommaso Fellin, Miho Terunuma, Raquel Revilla-Sanchez, David F Meaney, Yves P Auberson, Stephen J Moss, and Philip G Haydon. *mglur5* stimulates gliotransmission in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6):1995–2000, 2007.
- [126] Anthony D Umpierre, Peter J West, John A White, and Karen S Wilcox. Conditional knock-out of *mglur5* from astrocytes during epilepsy development impairs high-frequency glutamate uptake. *Journal of Neuroscience*, 39(4):727–742, 2019.