



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA TERRA,
DELL'AMBIENTE E DELLA VITA (DISTAV)

Classe delle Lauree Magistrali in Biologia LM/6

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Applicata e Sperimentale
curriculum biosanitario

OSSITOCINA IN ASTROCITI PRIMARI:
SEGNALI DI CALCIO E RILASCIO DI GLUTAMMATO

Laureando/a:
Alessia Todisco

Relatore:
Prof.ssa Chiara Cervetto

Correlatore:
Prof.ssa Monica Averna

ANNO ACCADEMICO 2025 - 2026

RIASSUNTO

Il ruolo dell'ossitocina nel regolare le funzioni delle cellule gliali negli ultimi anni è stato progressivamente riconosciuto. Studi precedenti hanno evidenziato che questo neuropeptide modula funzionalmente segnali intracellulari di Ca^{2+} e rilascio di glutammato da processi astrocitari di roditori adulti, con effetti duali.

L'obiettivo di questo studio è valutare l'espressione dei recettori dell'ossitocina in astrociti in coltura e valutarne gli effetti derivante dalla sua attivazione. In astrociti corticali primari di ratto la presenza dei recettori è stata analizzata mediante microscopia confocale, mentre gli effetti dell'attivazione recettoriale sono stati valutati studiando il rilascio di glutammato.

I risultati mostrano l'espressione dei recettori dell'ossitocina sia nel soma, sia nei prolungamenti degli astrociti. L'esposizione a concentrazioni nanomolari di ossitocina determina una risposta duale negli astrociti, caratterizzata da effetti sia facilitatori sia inibitori sul rilascio di glutammato. Tali effetti sono stati riprodotti anche mediante l'impiego di agonisti funzionali, carbetocina e atosiban. L'effetto facilitatorio risulta dipende dall'attivazione della via di segnalazione mediata dalla proteina G_q , mentre quello inibitorio dall'attivazione della via mediata dalla proteina G_i .

I risultati suggeriscono che gli effetti dell'ossitocina osservati negli astrociti in coltura potrebbero riflettere quelli che si verificano nei processi astrocitari maturi preparati da tessuto nervoso in cui gli astrociti si sono sviluppato all'interno delle reti neurone-astrocita, confermando l'utilità degli astrociti in coltura come modello per lo studio dei meccanismi molecolari della segnalazione dell'ossitocina e dei suoi effetti nella modulazione del rilascio di gliotrasmettitori.

ABSTRACT

In recent years, the role of oxytocin in regulating glial cell function has become increasingly recognised. Previous studies have shown that this neuropeptide functionally modulates intracellular Ca^{2+} signalling and glutamate release from astrocytic processes in adult rodents, with dual effects.

This study aimed to assess the expression of oxytocin receptors in cultured astrocytes and to evaluate the effects of their activation. In primary cortical astrocytes, the presence of the receptors was analysed using immunofluorescence and confocal microscopy, while the effects of receptor activation were assessed by studying glutamate release.

The results showed oxytocin receptors on both cell body and processes. Nanomolar concentrations of oxytocin induced dual responses, including facilitatory and inhibitory effects on glutamate release. The same responses were also reproduced by carbetocin and atosiban, which are functional agonists for oxytocin receptor. The facilitatory effect appeared to be related to the G_q -mediated signalling pathway, while the inhibitory effect depended on the G_i -mediated pathway.

These results suggest that the effects of oxytocin observed in cultured astrocytes may reflect those occurring in mature astrocytic processes prepared from adult striatum, where astrocytes develop within neuronal networks. This confirms the usefulness of cultured astrocytes as a model for studying the molecular mechanisms of oxytocin signalling and its effects on modulating transmitters release.

Ricerca svolta presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università degli Studi di Genova.

INDICE

1. INTRODUZIONE	2
1.1 SISTEMA OSSITOCINERGICO	2
1.2 ASTROCITI E LORO FUNZIONI	5
1.3 SEGNALAZIONE DELL'OSSITOCINA NEGLI ASTROCITI	7
2. SCOPO DELLA TESI.....	10
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 Colture primarie di astrociti.....	11
3.2 Rilascio endogeno di glutammato	12
3.3 Immunofluorescenza, immagini confocali e analisi morfologica	13
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	14
4.1 Espressione di OTR in astrociti.....	14
4.2 rilascio di endogeno di glutammato in risposta a OT	15
4.3 Risposte duali in astrociti esposti a 4-AP: atosiban e carbetocina	18
5. CONCLUSIONI.....	22
6. BIBLIOGRAFIA	23

1. INTRODUZIONE

1.1 SISTEMA OSSITOCINERGICO

L'ossitocina (OT) è un neuropeptide sintetizzato e rilasciato dai neuroni ipotalamici, presenti nel nucleo sopraottico (SON) e paraventricolare (PVN), noto soprattutto per le sue azioni periferiche che regolano la contrazione uterina e la produzione di latte durante l'allattamento. Tuttavia, agisce anche come segnale molecolare a livello centrale regolando di diversi comportamenti sociali ed emotivi tra cui l'ansia, l'aggressività, l'accudimento materno, il legame madre-figli e di coppia (Froemke and Young, 2021). Il sistema ossitocinergico partecipa inoltre a processi di apprendimento e formazione della memoria e alla riduzione dello stress e della paura (Talpo et al., 2023).

La maggior parte dell'OT prodotta viene secreta nel flusso sanguigno dalla neuroipofisi, svolgendo quindi un'azione come ormone, ma gli assoni ossitocinergici ipotalamici si estendono in realtà a diverse aree cerebrali extraipotalamiche come talamo, corteccia, amigdala, striato e ippocampo (Froemke and Young, 2021).

Gli effetti dell'ossitocina a livello centrale dipendono essenzialmente dalla presenza e funzione dei suoi recettori (OTR), ampiamente distribuiti in vari tessuti tra cui rene, cuore, timo, pancreas, adipociti, utero e cervello (Mitre et al., 2018). Tuttavia, in alcune aree cerebrali, come amigdala e bulbi olfattivi, si osserva una marcata discrepanza tra fibre ossitocinergiche e presenza dei recettori, che risultano di fatto in numero molto maggiore rispetto alle fibre. Questo suggerisce la capacità dell'OT di diffondere e raggiungere anche siti distanti esercitando un'azione ad ampio spettro nel cervello (Baskerville and Douglas, 2010).

Nello striato, in particolare, l'OT sembra essere coinvolta in meccanismi di piacere, ricompensa ed elaborazione di risposte abitudinali (Guidolin et al., 2025). Coerentemente, i deficit del sistema ossitocinergico sono connessi a diversi disturbi neuropsichiatrici e un comportamento aggressivo in quasi tutte le specie (Castagno et al., 2024; Guidolin et al., 2025).

Nell'uomo il recettore dell'ossitocina è codificato da un singolo gene, denominato OTR (ID:5021), localizzato sul braccio corto del cromosoma 3, nelle regioni p25-p26. Il gene si estende per circa 17 kilobasi (kb) ed è costituito da quattro esoni e tre introni. La sequenza genica presenta inoltre numerose isole CpG, particolarmente rilevanti nella regolazione epigenetica del DNA poiché soggette a modificazioni del loro stato di metilazione (Figura 1) (Wei et al., 2023).

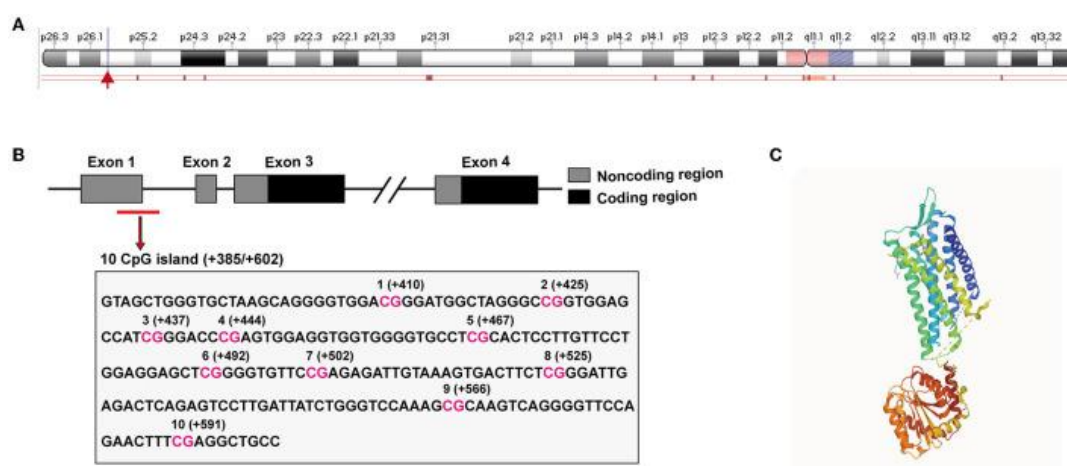


Figura 1. Struttura del gene OTR nell'uomo. (A) La posizione del gene sul cromosoma 3 è indicata da una freccia rossa. (B) Schema del gene OXTR nell'uomo. Gli esoni sono indicati da riquadri (codificanti → neri, non codificanti → grigi); gli introni corrispondono alle linee continue. (C) Struttura cristallina ai raggi X dell'OXTR (Wei et al., 2023).

Nel ratto, invece, il recettore dell'OT è codificato dal gene *Otr* (ID:25342) di circa 20kb, ortologo del gene umano OTR. La caratterizzazione del prodotto proteico mostra un'elevata conservazione rispetto al recettore umano, con un'identità di sequenza amminoacidica di circa il 93% (Rozen et al., 1995).

La variabilità del gene *OXTR*, attraverso polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e meccanismi di regolazione epigenetica, può influenzare il comportamento sociale e la predisposizione a diversi disturbi psichiatrici. Gli SNP determinano variazioni nella sequenza del DNA, mentre la metilazione del DNA di *OXTR* rappresenta un meccanismo epigenetico in grado di modulare la trascrizione del gene e quindi l'espressione del recettore dell'ossitocina. Esiste però un ampio dibattito su quali varianti degli SNP siano associate a un comportamento maggiormente prosociale e quali, invece, a minore empatia, evitamento e ridotta propensione all'interazione sociale. Le varianti di *OXTR* sembrano inoltre essere associate a modificazioni di specifiche regioni cerebrali coinvolte nella regolazione delle emozioni e del comportamento sociale, come amigdala, ipotalamo e corteccia (Tops et al., 2019).

Le alterazioni di *OXTR* sono state studiate in relazione a numerosi disturbi psichiatrici, tra cui disturbo dello spettro autistico (ASD), ADHD, disturbo borderline di personalità, aggressività, ansia, depressione, PTSD e schizofrenia. In questo contesto, gli SNP di *OXTR* sembrano essere associati più generalmente al funzionamento sociale, piuttosto che rappresentare caratteristiche specifiche dei singoli disturbi. Gli effetti possono infatti variare in funzione di etnia, sesso, età e contesto biologico (Wei et al., 2023).

Oltre alla variabilità della sequenza, anche la regolazione dell'espressione di *OXTR* può contribuire a determinare la quantità di recettore presente nelle cellule. Differenze nelle regioni promotrici del gene possono infatti determinare diversi livelli di espressione del recettore nei vari tessuti, con una distribuzione che può differire anche significativamente tra maschi e femmine (Figura 2) (Mitre et al., 2018).

Nel complesso, quindi, SNP e meccanismi epigenetici possono modulare rispettivamente la variabilità genetica e la trascrizione di *OXTR*, influenzando potenzialmente l'espressione e la funzione del recettore. Tuttavia, nei diversi fenotipi comportamentali e psichiatrici, gli effetti di queste variazioni sui meccanismi molecolari successivi al legame dell'ossitocina con OXTR e sulla quantità di recettore effettivamente presente sulla membrana cellulare sono ancora ampiamente sottovalutati e non completamente chiariti (Wei et al., 2023).

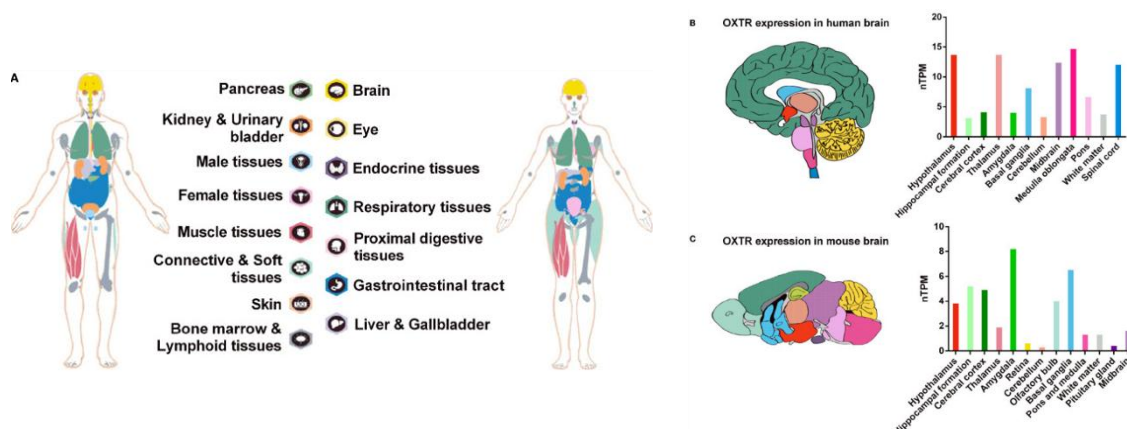


Figura 2. Distribuzione tissutale di OTR nell'uomo e nel topo. (A) Espressione di OTR nei tessuti e organi umani. (B,C) Espressione quantitativa relativa all'RNA di OTR nel cervello umano e di topo (Wei et al., 2023).

Il recettore OTR fa parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR), recettori metabotropi. I GPCRs hanno sette domini transmembrana ad α -elica e una porzione intracellulare che interagisce con proteine G, sono ampiamente distribuiti e attivati da diversi neurotrasmettitori come glutammato (Glu), acido γ -amminobutirrico (GABA), adenosina trifosfato (ATP), noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh), endocannabinoidi ecc... (Li et al., 2025). Possono agire sia come monomeri sia come parte di complessi recettoriali multimerici, che aumentano l'efficienza sinaptica e possono risultare bersagli terapeutici per malattie del SNC (Guidolin et al., 2021).

La singola proteina G è un complesso eterotrimerico formate dalle subunità α , β e γ .

Il legame con il ligando determina il distacco della subunità β/γ dal complesso, permettendo l'attività della subunità α (Jurek and Neumann, 2018) e la modulazione della cascata dei secondi messaggeri.

In base al tipo di subunità α e ai segnali a valle innescati dalla sua attività GTPasica, le proteine G possono essere classificate in quattro famiglie ovvero G_q , $G_{i/o}$, G_s e $G_{12/13}$. G_q , $G_{i/o}$ e G_s sono le proteine coinvolte nel controllo del segnale del Ca^{2+} intracellulare, regolando funzioni fisiologiche come il rilascio di gliotrasmettitori e la plasticità sinaptica (Li et al., 2025). Inoltre, in base al tipo di proteina G l'effetto della stimolazione del recettore sarà eccitatorio o inibitorio ma l'accoppiamento ad una specifica proteina dipende da diversi fattori tra cui lo stato fisiologico dell'animale, il tipo di cellula, la quantità e il tipo di ligando presente (Jurek and Neumann, 2018; Busnelli et al., 2012).

1.2 ASTROCITI E LORO FUNZIONI

Gli astrociti sono cellule gliali complesse con ramificazioni che si estendono distalmente dal soma e consentono loro di interagire con sinapsi, vasi sanguigni e altre cellule. I processi astrocitari, infatti, si intrecciano con quelli neuronali, circondano e avvolgono le sinapsi (Armbruster et al., 2022; Porter and McCarthy, 1997).

Gli astrociti svolgono diverse funzioni omeostatiche che contribuiscono a garantire la funzione neuronale e un microambiente ottimale per il mantenimento di un network fisiologico. Danno supporto metabolico ai neuroni, regolano la quantità di acqua nel microambiente e possiedono canali del potassio e trasportatori di amminoacidi per captare i neurotrasmettitori e controllarne la concentrazione extracellulare (Armbruster et al., 2022).

Considerando l'architettura e la distribuzione nei tessuti, gli astrociti si trovano quindi in stretta associazione con i neuroni, con cui condividono l'espressione di molti recettori, canali e trasportatori di membrana in modo da rispondere ai vari segnali anche attraverso depolarizzazione della membrana, regolando l'eccitabilità neuronale attraverso il controllo dell'omeostasi ionica extracellulare e delle concentrazioni dei neurotrasmettitori a livello sinaptico ed extra-sinaptico.

Tali funzioni sono determinanti per una modulazione della trasmissione sinaptica e per la propagazione del potenziale d'azione (Armbruster et al., 2022; Haydon and Carmignoto, 2006; Guidolin et al., 2021).

È dimostrato che gli astrociti sono cellule capaci di modulare il loro potenziale di membrana mostrando una forma di eccitabilità chimica che modula in microdominii i livelli intracellulari di Ca^{2+} (Perea et al., 2009; Nedergaard and Verkhratsky, 2012). Questa capacità deriva dall'espressione di recettori specifici per diversi neurotrasmettitori e di canali ionici tra cui quelli voltaggio dipendenti.

La presenza di recettori di membrana fa sì che gli astrociti possano rispondere in modo selettivo alla presenza di neurotrasmettitori e, attraverso un rilascio sia esocitotico che non-vescicolare, rilasciare a loro volta gliotrasmettitori come glutammato, D-serina, ATP, adenosina, GABA, fattore di necrosi tumorale α ($\text{TNF}\alpha$), prostaglandine, proteine e peptidi che agiscono sui recettori neuronali (pre- e post- sinaptici), modulandone l'attività (Porter and McCarthy, 1997; Perea et al., 2009).

Inoltre considerando l'estensione dei vari prolungamenti astrocitari, la regolazione dell'eccitabilità dei neuroni prodotta dagli astrociti potrebbe riguardare singole sinapsi oppure essere più generica e interessare molte sinapsi o neuroni con azioni sia eccitatorie che inibitorie sincrone (Porter and McCarthy, 1997; Haydon and Carmignoto, 2006).

La relazione tra astrociti e neuroni è quindi bidirezionale, ovvero l'attività neuronale influenza quella astrocitaria e viceversa, in quella che viene definita "sinapsi tripartita" (Amato et al., 2022; Amato et al., 2023). Questa comunicazione bidirezionale è ritenuta fondamentale per il mantenimento delle normali funzioni neuronali. In varie condizioni neurologiche o disturbi psichiatrici sono state infatti riscontrate modifiche nella struttura e/o funzione degli astrociti comportando un'alterata modulazione delle sinapsi nelle vicinanze e danni eccitotossici ai neuroni circostanti (Haydon and Carmignoto, 2006; Rossi and Volterra, 2009). Nelle malattie neurodegenerative ritroviamo una disregolata attività del Ca^{2+} , dell'uptake del glutammato e della respirazione mitocondriale anche nelle cellule gliali tra cui appunto gli astrociti, con perdita di sinapsi e ripercussioni sulla salute delle cellule neuronali (Brandebura et al., 2023).

1.3 SEGNALAZIONE DELL'OSSITOCINA NEGLI ASTROCITI

Fino a poco tempo fa si riteneva infatti che i recettori per l'OT fossero espressi solo in specifiche classi di neuroni e che quindi l'OT agisse quasi esclusivamente su di essi, trascurando le sue azioni sulle cellule gliali (Talpo et al., 2023; Castagno et al., 2024). Crescenti evidenze indicano invece che anche gli astrociti contribuiscono agli effetti dell'OT a livello centrale.

In particolare, negli astrociti, l'OT potrebbe indurre sia una facilitazione che un'inibizione dei segnali del Ca^{2+} , proprio grazie alla capacità degli OTR di accoppiarsi a vie stimolatorie o inibitorie.

Le azioni eccitatorie dell'OT risultano date dall'accoppiamento di OTR con la via di segnalazione mediata dall'attivazione della proteina G_q , mentre quelle inibitorie sembrano da attribuire all'attivazione di una via dipendente dalla proteina G_i .

In letteratura è riportato che entrambe le vie di segnalazione sono evocate da concentrazioni di OT nanomolari in processi astrocitari isolati studiando il rilascio di glutammato e le variazioni delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} (Farsetti et al. 2025), anche se non ci sono molti articoli scientifici che approfondiscono questi aspetti funzionali e farmacologici. Molte conoscenze che abbiamo infatti su OTR e sulla trasduzione del segnale derivano spesso o da cellule transfettate con OTR o traslando le nozioni acquisite su neuroni.

La trasduzione del segnale mediato da attivazione di GPCRs accoppiati a proteina G_q viene usualmente descritta attraverso l'osservazione di un aumento di Ca^{2+} intracellulare attraverso due meccanismi principali: il primo prevede l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e la generazione di inositolo trifosfato (IP3) e 1,2-diacilglicerolo (DAG). L'IP3 provoca il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari, mentre DAG stimola la proteina chinasi C (PKC), che ha attività fosforilase su diversi target. Il secondo meccanismo avviene tramite l'inibizione dei canali del potassio, inducendo una depolarizzazione della membrana e l'ingresso di Ca^{2+} dai canali voltaggio-dipendenti.

Nelle cellule neurosecretorie, l'aumento del Ca^{2+} intracellulare impatta sull'eccitabilità di membrana e il rilascio di neurotrasmettitori (Figura 1) (Bakos et al., 2018; Gimpl and Fahrenholz, 2001).

La via di segnalazione dell'OTR diventa di conseguenza sempre più rilevante nella determinazione del comportamento individuale agendo in diverse aree centrali del SNC:

- OT nell'amigdala influenza la manifestazione di paura, stati ansiosi e dolore neuropatico (Wahis et al., 2021);
- in astrociti *in vitro* e *in vivo* induce un rimodellamento citoscheletrico per regolare la morfologia cellulare, le relazioni spaziali e le distanze tra le cellule, impattando sull'effetto delle molecole di segnalazione e contribuendo all'ansiolisi (Meinung et al., 2025);
- nell'amigdala di ratti l'OT viene rilasciata in seguito ad uno stress acuto e la risposta ad esso è mediata da cambiamenti degli OTR negli astrociti (Baudon et al., 2025).
- OT influenza, ad esempio, anche vie dopaminergiche implicate nella creazione di legami e interazioni sociali, tossicodipendenza e astinenza ed è noto che una disfunzione dopaminergica negli esseri umani è coinvolta in disturbi quali autismo, malattia di Parkinson e depressione (Jurek and Neumann, 2018).

La possibilità di manipolare farmacologicamente cascate di segnalazione potrebbe contribuire a sviluppare terapie innovative basate sull'utilizzo di OT o di suoi agonisti, importanti per regolare comportamenti sociali e disturbi cognitivi (Busnelli et al., 2012).

Atosiban e carbetocina sono oggi entrambi considerati agonisti funzionali per OTR e nei processi astrocitari isolati hanno riprodotto rispettivamente gli effetti inibitori e facilitatori dell'OT sia sui segnali intracellulari di Ca^{2+} sia sul rilascio di glutammato (Farsetti et al., 2025).

Poiché queste due molecole sono in grado di favorire in modo selettivo l'accoppiamento di OTR a specifiche proteine G, questi composti rappresentano una promettente strategia farmacologica per modulare in maniera mirata l'attività recettoriale, con l'obiettivo di migliorare l'efficacia e la precisione dei trattamenti in ambito neurologico e psichiatrico (Busnelli et al., 2026).

Atosiban, generalmente utilizzato per ritardare il parto inibendo le contrazioni uterine, è un ligando sintetico dell'OTR, agonista parziale che favorisce l'accoppiamento del recettore con la proteina G_i inibitoria.

Carbetocina, usata prevalentemente per indurre la produzione di latte e le contrazioni uterine, agisce invece come agonista dell'OTR che si accoppia in modo specifico con la proteina G_q , mediando effetti ansiolitici e antidepressivi propri di OT (Jurek and Neumann, 2018; Busnelli et al., 2026; Cai et al., 2026).

2. SCOPO DELLA TESI

Considerando che OT e il suo recettore stanno acquisendo un peso sempre maggiore su diversi disturbi cognitivi e comportamentali e che molte conoscenze relative a OTR e la sua trasduzione del segnale derivano o da cellule transfettate con il recettore o traslando le nozioni acquisite su neuroni, scopo di questo lavoro di ricerca sperimentale è quindi quello di studiare l'espressione dell'OTR, gli effetti dell'OT e il suo accoppiamento alle vie stimolatorie e inibitorie in un modello in vitro molto usato nei laboratori di neurobiologia e neurofarmacologia come gli astrociti corticali primari.

In astrociti in coltura, morfologicamente assimilabili alle cellule gliali osservabili in campioni di tessuto nervoso adulto e funzionalmente attivi, capaci di rispondere a stimoli depolarizzanti simil fisiologici con rilascio di glutammato e variazioni delle $[Ca^{2+}]$ intracellulari, si analizzano le risposte funzionali misurando la liberazione di glutammato endogeno in perfusione continua verticale in seguito a manipolazione farmacologica di OTR. Inoltre, si approfondiscono gli studi relativi alle vie di trasduzione del recettore anche in seguito a stimolazione con atosiban e carbetocina, ligandi sintetici di OTR che attivano rispettivamente e selettivamente la via G_i e la via G_q . (Farsetti et al., 2025; Jurek and Neumann, 2018).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture primarie di astrociti

Le colture primarie di astrociti sono state ottenute da neocortecce isolate di ratti Sprague Dawley, di età compresa tra 0 e 2 giorni. I cuccioli sono nati nella struttura stabulativa del Dipartimento di Farmacia (DIFAR) dell'Università di Genova. Gli animali alloggiavano in condizioni ambientali standard e controllate, con libero accesso ad acqua e mangime.

Le procedure di allevamento e utilizzo degli animali sono state condotte nel rispetto della Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio e del Decreto Legislativo italiano n. 26/2014. L'impiego degli animali è stato autorizzato dal Ministero della Salute italiano (protocolli n. 75F11.N.P3C, agosto 2019, e n. 75F11.N.FIE, dicembre 2023), in accordo con quanto previsto dal Decreto Ministeriale 116/1992.

Durante l'intero studio sono state adottate tutte le precauzioni necessarie per limitare la sofferenza animale e ridurre al minimo il numero di soggetti impiegati.

Dopo essere state isolate, le cortecce sono state dissociate enzimaticamente per 20 min con papaina (3 U/mL) in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) più L-cisteina (1 mM) e DNaseI.

Le cellule sono state quindi piastrate su fiasche e mantenute in vitro per 7 giorni in un'atmosfera di 5% CO₂ / 95% aria in terreno DMEM con 1 mM di piruvato di sodio, 2 mM di L-glutammina, con 10% di siero fetale bovino (FBS) e 1% di penicillina e streptomycin.

A 7 DIV le colture sono state agitate a 1800 rpm e ripiastrate, in modo da ottenere colture astrogliali arricchite.

La stellazione degli astrociti è stata indotta mediante l'aggiunta di forskolina (FSK, 10 µM) al mezzo di coltura, mantenuto per una settimana. La forskolina è un noto attivatore dell'adenilato ciclasi coinvolta nella modificazione del citoscheletro e quindi nell'acquisizione del fenotipo stellato (Gottfried et al., 2003; Saura, 2007). [38, 41]

A 14 DIV le cellule sono state condotte le prime analisi funzionali e di immunofluorescenza.

Per limitare la presenza di cellule microgliali contaminanti, il mezzo di coltura è stato sostituito regolarmente, con una frequenza di almeno una volta ogni 2–3 giorni. Le colture sono poi state sottoposte a tripsinizzazione e in seguito ripiastrate (Favero and Mandell, 2007). [40]

3.2 Rilascio endogeno di glutammato

Per la valutazione del rilascio endogeno di glutammato, tra il 20° e il 22° giorno in vitro (20-22 DIV) il mezzo di coltura è stato sostituito con DMEM fresco privo di siero.

Successivamente circa 5×10^6 - 5×10^7 astrociti sono stati staccati e trasferiti, mantenendo l'organizzazione in monostrato, nelle camere inferiori di un sistema di superfusione.

Una parte della sospensione cellulare è stata prelevata per la quantificazione del contenuto proteico mediante saggio di Bradford (McCarthy and de Vellis, 1976). [37]

Gli esperimenti di rilascio sono stati eseguiti utilizzando un mezzo HEPES mantenuto alla temperatura di 37 °C.

La metodica di superfusione prevede un flusso continuo di mezzo pari a 0,5 mL/min, al fine di prevenire la formazione di una biofase recettoriale e di evitare effetti indiretti dovuti all'accumulo di molecole rilasciate dalle cellule.

Per caratterizzare farmacologicamente i bersagli molecolari oggetto di studio e le vie di trasduzione del segnale intracellulare coinvolte, i diversi ligandi e modulatori recettoriali sono stati aggiunti al mezzo di superfusione secondo il protocollo sperimentale previsto.

Ogni 10 minuti il mezzo HEPES è stato rimosso dalle superfici cellulari attraverso una pompa peristaltica e dopo un periodo di superfusione sono stati raccolti due campioni di 3 minuti da ciascuna camera.

Attraverso la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), gli amminoacidi sono stati sottoposti a derivatizzazione pre-colonna automatica con o-ftalaldeide (OPA), a cui ha seguito la separazione mediante cromatografia in fase inversa su colonna C18 e la rivelazione fluorimetrica. L'omoserina è stata utilizzata come standard interno e il limite di rilevazione del metodo era pari a 100 fmol/ μ L (Rogawski and Barker, 1983). [45]

In questo modo abbiamo determinato la quantità di glutammato rilasciato nei campioni e il valore medio delle quantità è stato utilizzato come deflusso basale.

Sono stati raccolti anche altri campioni relativi all'applicazione di OT, 4-AP (300 μ M), carbetocina e atosiban.

Gli effetti dei farmaci sono stati quantificati come deflusso sottraendo dal deflusso di glutammato nelle camere trattate quello nelle camere utilizzate come controllo.

3.3 Immunofluorescenza, immagini confocali e analisi morfologica

Circa 5×10^4 astrociti sono stati piastrati su vetrini coprioggetto pre-rivestiti.

A 20-22 DIV, le cellule sono state fissate con paraformaldeide (PFA 4%) per 15 minuti a temperatura ambiente e in una soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), supplementata con Triton X-100 (0,02%) e albumina di siero bovino (0,5%).

Gli astrociti sono stati poi incubati una notte a 4 °C con anticorpi primari anti-GFAP di capra (1:500), anti-GFAP di coniglio (1:1000), anti-RIP di topo (1:10.000), anti-CD11b di topo (1:25), anti-Aldh1L1 di topo (1:1000); anti-OTR di coniglio (1:100), anticorpo monoclonale di topo anti-ezrin, anticorpo policlonale di coniglio anti-VGLUT1 (1:400), anticorpo policlonale di cavia anti-VGLUT2 (1:200) e anticorpo policlonale di capra anti-EAAT2 (1:250).

Dopodiché sono stati incubati a temperatura ambiente per 1 ora con anticorpi secondari coniugati con sonde AlexaFluor 488, 546 o 633 in PBS supplementato con BSA al 3% e montati i vetrini coprioggetto.

Le immagini sono state acquisite tramite microscopia confocale, utilizzando un laser a luce bianca per simulare le lunghezze d'onda d'eccitazione, filtri specifici e tre rilevatori.

Sono stati utilizzati un obbiettivo 100x, un 20x e il software LAS X.

Le immagini a campo chiaro invece, sono state ottenute con un microscopio ottico invertito Nikon TMS.

La funzione di misura in Fiji (Schindelin et al., 2012) [50] è stata usata per valutare la morfologia degli astrociti e la colorazione GFAP per quantificare l'area superficiale e del perimetro cellulare, parametri utilizzate per determinare il fattore di forma cellulare ($CSF = 4 \times \pi \times S/p^2$ dove S è l'area superficiale e p il perimetro cellulare) (Pirnat et al., 2021). [51]

I dati sono presentati come media $\pm$ errore standard della media (SEM) del numero di esperimenti (n). Per valutare la significatività delle differenze sono stati eseguiti il test *t di Student*, l'ANOVA a una via e il test *post hoc di Bonferroni*; la significatività statistica è stata fissata a $p < 0,05$. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software Prism 4.02.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio derivano da una ricerca condotta nei laboratori di Farmacologia del Dipartimento di Farmacia e saranno parte della tesi di dottorato della dott.ssa Elisa Farsetti. Il modello biologico usato è quello degli astrociti primari corticali in coltura.

A 19-21DIV le colture astrogliali si erano mostrate scarsamente contaminate da cellule microgliali od oligodendrociti e gli astrociti avevano acquisito una morfologia comparabile a quella osservabile nel tessuto nervoso adulto e hanno dimostrato di aver raggiunto una maturazione funzionale (Farsetti et al., 2026).

4.1 Espressione di OTR in astrociti

Attraverso esperimenti di immunofluorescenza si è potuto dimostrare l'espressione del recettore per OT in cellule positive per GFAP, marcatore astrocitario ampiamente utilizzato, e per ezrin, proteina apicale che si localizza in particolare sui processi astrocitari e sui vari pedicelli che caratterizzano la superficie astrocitaria (Derouiche and Frotscher, 2001).

La distribuzione di OTR è mostrata in Figura 4 e in particolare si può osservare una marcatura in verde (Figura 4A) sia a livello del soma sia lungo i processi astrocitari.

Le immagini acquisite (Figura 4) a microscopio confocale sono relative ad un singolo piano focale, quello più superficiale per la cellula del campo di acquisizione, ed infatti la marcatura con ezrin (Figura 4B) sembra essere molto estesa sull'astrocita mentre quella per GFAP (Figura 4C) è relativa alla presenza della proteina fibrillare acida all'intero dei processi più spessi.

La composizione dei tre canali acquisiti con falsi colori permette di focalizzare la nostra attenzione ai recettori OTR co-localizzati con ezrin proprio alla superficie cellulare esterna dell'astrocita.

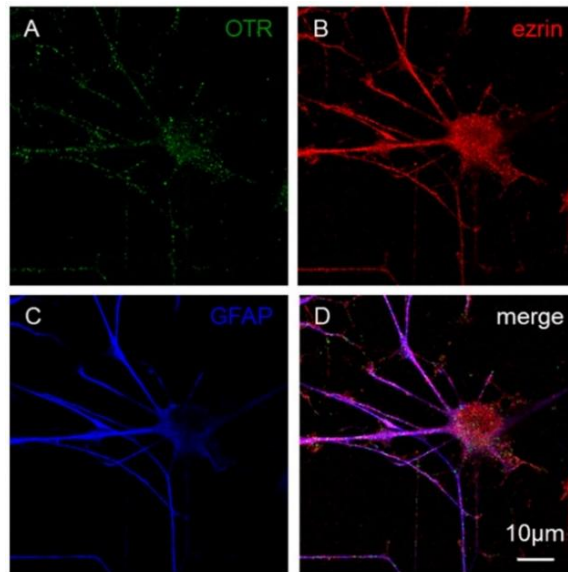


Figura 4. Espressione di OTR in astrociti primari in coltura.

L' emibrain di ratto adulto maschio è stato fissato in PAF 4%, incluso in OCT e quindi tagliato con criostato grazie alla collaborazione della Prof.ssa Candiani del DISTAV, UNIGE.

La fettina è stata quindi trattata secondo il protocollo descritto nella sezione Materiali e Metodi. Abbiamo usato falsi colori per le diverse marcature ed in particolare l'immagine mostra l'espressione di OTR (verde, (A)), di ezrin (rosso, (B)) e di GFAP (blu, (C)). Nella composizione dei tre canali (D) si può notare la co-localizzazione di OTR con i marcatori gliali. La scala è riportata come barra (10 μ m).

Astrociti primari corticali esprimono quindi recettori OTR, il target di nostro interesse e oggetto di successiva caratterizzazione farmacologica.

4.2 rilascio di endogeno di glutammato in risposta a OT

La tecnica della superfusione, messa a punto per studiare il rilascio di neurotrasmettitori da terminali nervosi isolati, i sinaptosomi (Raiteri & Raiteri 2000), è stata qui adattata per valutare il rilascio di glutammato endogeno da parte di astrociti primari.

I dati riportati derivando da un elevato set di esperimenti ($n = 13$) per cui è stato calcolato il rilascio basale medio di glutammato raccolto nelle prime due frazioni raccolte e misurato attraverso dosaggio HPLC a fasi inverse e detector fluorimetrico. L' efflusso medio di glutammato è risultato pari a $674,7 \pm 61,51$ pmol/mg di proteine quando gli astrociti erano perfusi con medium fisiologico standard.

In queste condizioni sperimentali, l'aggiunta di OT al medium di perfusione evocava un incremento del rilascio di glutammato endogeno in maniera concentrazione-dipendente a partire dalla concentrazione 30 nM (Figura 5).

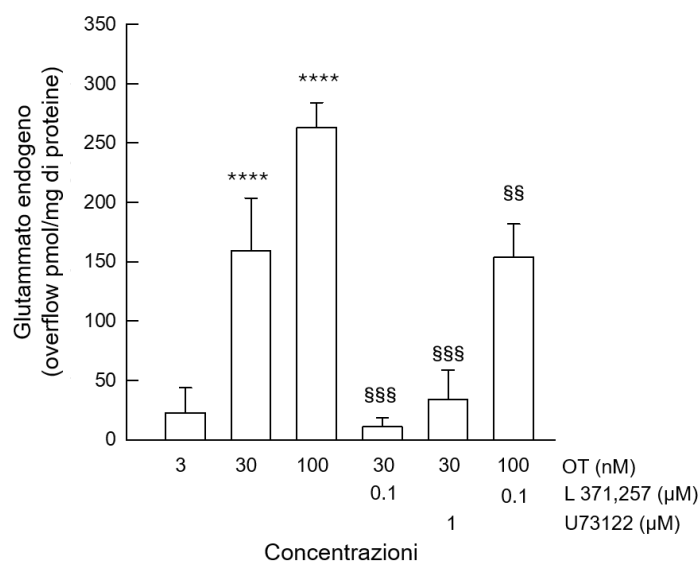


Figura 5. Efflusso di glutammato endogeno in risposta all'attivazione dell'OTR negli astrociti.

Rilascio di glutammato in condizioni basali: assenza di un effetto dell'OT alla concentrazione di 3 nM e aumento dell'efflusso di glutammato in risposta all'OT alle concentrazioni di 30 nM e 100 nM. Antagonismo del rilascio evocato dall'OT da parte dell'antagonista selettivo dell'OTR L 371,257. Modulazione del rilascio evocato dall'OT 30 nM da parte dell'inibitore della fosfolipasi C (PLC) U73122.

Il grafico mostra l'eccesso di glutammato endogeno, espresso come pmol/mg di proteina, in presenza dei farmaci alle concentrazioni indicate. L'OT è stata applicata per 6 minuti durante la perfusione; L 371,257 o U73122 sono stati aggiunti al mezzo 8 minuti prima dell'applicazione dell'OT. Per ulteriori informazioni sugli esperimenti, si veda la sezione "Materiali e Metodi".

*I dati sono espressi come media $\pm$ SEM di $n = 5-7$ esperimenti indipendenti. È stata eseguita un'analisi mediante ANOVA a una via per valutare gli effetti dell'OT alle diverse concentrazioni in condizioni basali ($p < 0,0001$) e per valutare le differenze tra i seguenti gruppi: **** $p < 0,0001$ rispetto a OT 3 nM; §§§ $p = 0,0001$ e §§ $p < 0,001$ rispetto all'effetto dell'OT alla stessa concentrazione, ma in assenza di L 371,257 o U73122, secondo il test post hoc di Bonferroni.*

OT, ossitocina.

La caratterizzazione farmacologica del target attraverso cui OT mediava il suo effetto è stata condotta usando l'antagonista selettivo per OTR, L 371,257. La perfusione continua in presenza di questo antagonista non modificava di per sé la liberazione basale di glutammato ma inibiva il rilascio indotto da OT 30 nM e 100 nM, indicando chiaramente il coinvolgimento dell'OTR nelle risposte osservate (Figura 5).

Considerando che il recettore per OT appartiene alla famiglia dei GPCRs, per identificare la proteina G coinvolta e la via intracellulare attivata sono stati condotti esperimenti in presenza dell'inibitore della PLC U73122 (Smith et al., 1990). A concentrazione 1 μ M, U73122 non modificava di per sè la liberazione basale di glutammato ma determinava una significativa inibizione della risposta indotta da OT 30 nM. Tale dato sperimentale suggerisce il coinvolgimento dell'attivazione di PLC e il reclutamento di proteina G del tipo G_q.

Per collezionare una contro-prova del coinvolgimento di G_q nella trasduzione del segnale evocato dall'attivazione di OTR si è quindi deciso di usare carbetocina, un farmaco ospedaliero utilizzato principalmente per la prevenzione dell'atonia uterina e dell'emorragia post-parto una molecola che in letteratura è descritta come un agonista per OTR ma funzionalmente selettivo nel promuovere l'accoppiamento del recettore con la proteina G_q (Passoni et al., 2016).

Come illustrato in Figura 6, la presenza di carbetocina durante la perfusione degli astrociti primari induceva un aumento del rilascio di glutammato e tale risposta risultava significativamente inibita dall'antagonista L 371,257, confermando anche per carbetocina il coinvolgimento dell'OTR e il reclutamento di G_q e la conseguente attivazione della via della PLC nel fenomeno studiato.

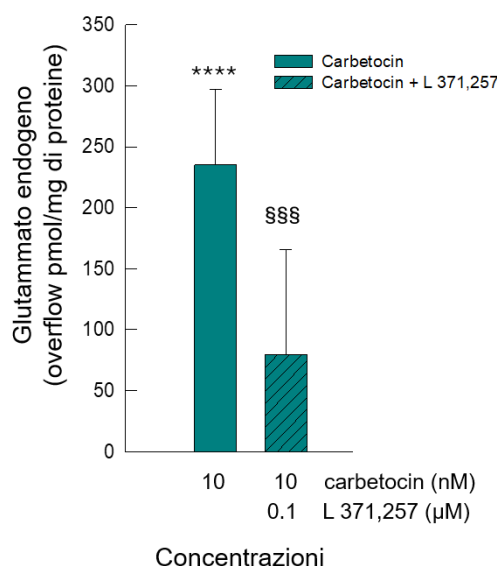


Figura 6. Efflusso di glutammato endogeno in risposta all'attivazione dell'OTR negli astrociti. Rilascio di glutammato in condizioni basali: aumento dell'efflusso di glutammato indotto dall'agonista carbetocina alla concentrazione di 10 nM. Antagonismo del rilascio evocato dalla carbetocina da parte dell'antagonista selettivo dell'OTR L 371,257. Il grafico mostra l'eccesso di glutammato endogeno, espresso come pmol/mg di proteina, in presenza dei farmaci alle concentrazioni indicate.

La carbetocina è stata applicata per 6 minuti durante la superfusione; L 371,257 è stato aggiunto al mezzo 8 minuti prima della carbetocina. Per ulteriori informazioni sugli esperimenti, si veda la sezione “Materiali e Metodi”.

I dati sono espressi come media $\pm$ SEM di $n = 5$ esperimenti indipendenti. È stato applicato il *t*-test per valutare gli effetti della carbetocina in condizioni basali e per valutare le differenze in presenza di L 371,257: **** $p < 0,0001$ rispetto all'assenza di carbetocina; §§§ $p = 0,0001$ rispetto all'effetto della carbetocina in assenza di L 371,257.

4.3 Risposte duali in astrociti esposti a 4-AP: atosiban e carbetocina

Nelle stesse condizioni sperimentali, l'esposizione degli astrociti a 4-AP (300 μ M), bloccante dei canali del potassio, determinava un incremento del rilascio del gliotrasmettitore (Figura 7).

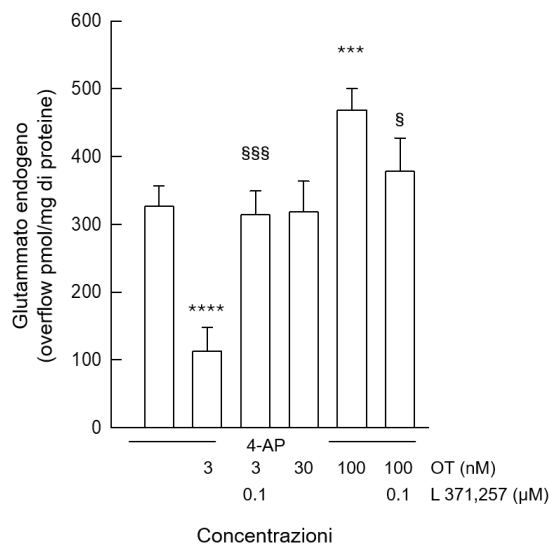


Figura 4. Rilascio di glutammato da astrociti primari esposti a 4-AP durante la superfusione.

Rilascio di glutammato in presenza di 4-AP (300 μ M): inibizione dell'efflusso di glutammato da parte dell'OT 3 nM, assenza di effetto dell'OT 30 nM e aumento dell'efflusso indotto dall'OT 100 nM. Antagonismo da parte dell'antagonista selettivo dell'OTR L 371,257.

Il grafico mostra l'eccesso di glutammato endogeno, espresso come pmol/mg di proteina, in presenza dei farmaci alle concentrazioni indicate. Durante la superfusione, 4-AP e OT sono stati applicati per 6 minuti; L 371,257 è stato aggiunto 8 minuti prima degli agonisti. Per ulteriori informazioni sugli esperimenti, si veda la sezione “Materiali e Metodi”.

I dati sono espressi come media $\pm$ SEM di $n = 3-11$ esperimenti indipendenti. È stata eseguita un'analisi mediante ANOVA a una via per valutare gli effetti dell'OT alle diverse concentrazioni in presenza di 4-AP ($p < 0,0001$) e per valutare le differenze tra i seguenti gruppi: **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$ rispetto all'effetto della sola 4-AP; §§§ $p < 0,001$ rispetto all'effetto dell'agonista OT alla stessa concentrazione in assenza di L 371,257, secondo il test post hoc di Bonferroni.

OT, ossitocina; 4-AP, 4-aminopiridina.

In realtà, sebbene per decenni si sia ritenuto che negli astrociti non fossero presenti meccanismi vescicolari di rilascio dei gliotrasmettitori, negli ultimi 40 anni le prove sperimentali ottenute anche su astrociti in coltura hanno dimostrato che gli astrociti sono dotati di trasportatori vescicolari per glutammato di tipo 1 e 2 (VGLUT1 e 2) e che 4-AP si è dimostrato capace di determinare un aumento della $[Ca^{2+}]$ intracellulare (Farsetti et al. 2026). Di conseguenza gli astrociti in coltura, raggiunto un adeguato livello di maturazione *in vitro*, sono forniti di meccanismi per un rilascio di gliotrasmettitori basato sulle vescicole e sono in grado di rispondere all'aumento intracellulare di calcio con la fusione delle membrane vescicolari con la membrana plasmatica e quindi permettere il rilascio del gliotrasmettitore nello spazio extracellulare (Gucek et al., 2012; Vardjan and Zorec, 2015). Ipotizziamo quindi che l'aumento del Ca^{2+} intracellulare dovuto alla depolarizzazione indotta dal 4-AP possa attivare la fusione della membrana vescicolare con la membrana plasmatica, consentendo il rilascio vescicolare di glutammato.

In condizione di depolarizzazione, OT mostrava un effetto duale in base alla concentrazione usata: alla concentrazione 3 nM OT inibiva il rilascio di glutammato indotto da 4-AP, alla concentrazione di 30 nM non si osservavano variazioni significative, mentre alla concentrazione 100 nM OT determinava un ulteriore rilascio di glutammato (Figura 7). L'effetto inibitorio indotti da OT 3 nM così come quello facilitatorio indotto da OT 100 nM erano significativamente attenuati in presenza dell'antagonista dell'OTR L 371,257. Questi risultati indicano che entrambe le tipologie di risposta sono mediate dall'attivazione di OTR.

A controprova dell'esistenza di una risposta duale negli astrociti in coltura esposti a 4-AP, sono stati condotti esperimenti usando gli agonisti funzionali. Atosiban, noto per favorire l'accoppiamento dell'OTR alla proteina G_i (Reversi et al., 2005), alla concentrazione indicata produceva un effetto inibitorio sul rilascio di glutammato indotto da 4-AP, mentre carbetocina determinava un incremento del rilascio del gliotrasmettitore endogeno (Figura 8).

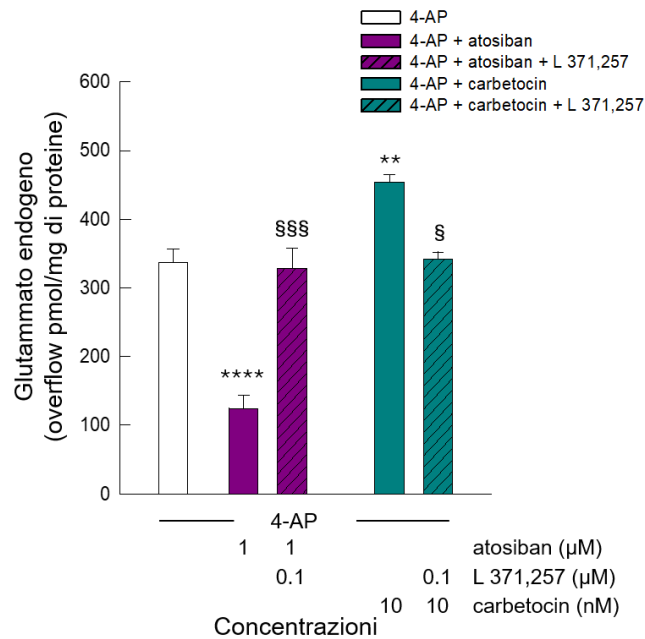


Figura 8. Rilascio di glutammato in presenza di 4-AP (300 μ M): effetti duali degli agonisti biased.

Mentre l'agonista selettivo atosiban ha mimato l'effetto dell'OT 3 nM sull'efflusso di glutammato evocato dalla 4-AP, l'agonista selettivo carbetocina 10 nM ha aumentato il rilascio di glutammato evocato dalla 4-AP. Antagonismo da parte dell'antagonista selettivo dell'OTR L 371,257.

Il grafico mostra l'eccesso di glutammato endogeno, espresso come pmol/mg di proteina, in presenza dei farmaci alle concentrazioni indicate. Durante la superfusione, 4-AP, atosiban o carbetocina sono stati applicati per 6 minuti; L 371,257 è stato aggiunto 8 minuti prima degli agonisti. Per ulteriori informazioni sugli esperimenti, si veda la sezione "Materiali e Metodi".

I dati sono espressi come media $\pm$ SEM di $n = 3-11$ esperimenti indipendenti. È stata eseguita un'analisi mediante ANOVA a una via per valutare gli effetti di atosiban o carbetocina in presenza di 4-AP ($p < 0,0001$) e per valutare le differenze tra i seguenti gruppi: **** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,01$ rispetto all'effetto della sola 4-AP; §§§ $p < 0,001$ e § $p < 0,05$ rispetto all'effetto degli agonisti atosiban o carbetocina in assenza di L 371,257, secondo il test post hoc di Bonferroni.

4-AP, 4-aminopiridina.

Gli effetti inibitori indotti da OT3 nM e atosiban, così come quelli facilitatori indotti da OT 100 nM e carbetocina sull'efflusso di glutammato, sono risultati significativamente attenuati in presenza dell'antagonista dell'OTR L 371,257 (Figura 8). Questi risultati indicano che entrambe le tipologie di risposta sono mediate dall'attivazione del recettore dell'ossitocina (OTR).

Le duplice risposte evocate dall'OT, ovvero di stimolazione e inibizione del rilascio di glutammato, risultavano dunque tali a seconda dello stato funzionale della cellula e delle vie intracellulari coinvolte. Le vie intracellulari implicate sono quelle dipendenti dall'attivazione di OTR accoppiato alle proteine G_q e G_i.

La facilitazione è legata alla via dipendente dalla G_q con rilascio di Ca²⁺ da parte dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (Aguilhon et al., 2008), mentre quando la membrana è depolarizzata e la sintesi di cAMP è attiva, possono sorgere effetti inibitori legati alla via dipendente dalla G_i, che inibisce l'adenilato ciclasi e riduce il cAMP intracellulare (Alberti et al., 1997; Wettschureck and Offermanns, 2005).

I risultati sugli agonisti e antagonisti selettivi confermano la capacità di OTR di accoppiarsi a doppie vie e il risultato degli astrociti in coltura riproduce quello in processi astrocitari di astrociti adulti maturati *in situ*, nel tessuto maturo in cui si sono realizzate delle connessioni astrocita-neurone fisiologiche (Farsetti et al., 2025).

Dobbiamo però tenere in considerazione che gli astrociti primari in coltura sono un modello semplificato e potrebbero non riflettere la complessità delle condizioni *in vivo*. Inoltre, l'interpretazione dell'accoppiamento alle vie G_q/G_i e dei meccanismi di rilascio del glutammato potrebbe essere semplificativa.

Un'ulteriore limitazione dello studio riguarda le concentrazioni di OT in prossimità del recettore, la quale varia in funzione del tempo, della regione cerebrale considerata, della fonte, del momento di secrezione e dalla localizzazione del recettore. Pertanto, solo un'ampia varietà di concentrazioni, comprese quelle nano e sub-nanomolari (Liu et al., 2025), potrebbero avere una rilevanza fisiologica.

5. CONCLUSIONI

Questo studio fornisce evidenze a sostegno della capacità dell'ossitocina (OT) di modulare il rilascio del gliotrasmettitore glutammato negli astrociti primari di roditori.

In particolare, l'esposizione a concentrazioni nanomolari di OT ha determinato sia un aumento sia un'inibizione del rilascio di glutammato, evidenziando una modulazione duale delle risposte astrocitarie. L'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti ha indicato che, negli astrociti, l'OT è in grado di attivare sia una via eccitatoria mediata dalla via Gq sia una via inibitoria dipendente da Gi, la cui attivazione risulta influenzata dallo stato di depolarizzazione della membrana.

I risultati ottenuti nelle colture primarie di astrociti confermano quanto osservato nei processi astrocitari isolati di recente da astrociti maturi appartenenti a una rete neurone–astrocita. Infatti, anche nei singoli processi derivati da astrociti striatali adulti sono stati riscontrati effetti sia eccitatori che inibitori da parte dell'OT. La risposta bidirezionale non sembra quindi essere una caratteristica esclusiva dei processi astrocitari isolati.

Ulteriori studi saranno necessari per approfondire i meccanismi alla base della modulazione duale esercitata dall'OT, in particolare, quali condizioni cellulari e molecolari determinano la prevalenza della componente eccitatoria o inibitoria della risposta, nonché approfondire il ruolo della distribuzione del recettore OTR nei diversi compartimenti astrocitari e cerebrali. Sarà inoltre importante verificare se i meccanismi osservati nelle colture primarie siano mantenuti in modelli sperimentali più complessi, quali le reti neurone–astrocita, al fine di comprendere le possibili conseguenze della modulazione ossitocinergica sulla comunicazione tra cellule gliali e neuroni.

Questi aspetti potrebbero assumere particolare rilevanza anche nel contesto dei disturbi neurologici e neuropsichiatrici nei quali è stata ipotizzata un'alterazione della segnalazione ossitocinergica.

Sebbene il seguente studio non miri a stabilire il coinvolgimento diretto degli astrociti nei meccanismi patologici di queste condizioni, la loro capacità di rispondere all'OT e modulare il rilascio di glutammato suggerisce un'implicazione della componente gliale che merita approfondimenti.

Comprendere come le alterazioni della segnalazione dell'OT possano modificare la funzione astrocitaria e, conseguentemente, la comunicazione neurone–astrocita potrebbe contribuire a una più completa comprensione dei meccanismi cellulari alla base delle alterazioni neurologiche e comportamentali associate al sistema ossitocinergico.

6. BIBLIOGRAFIA

Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron*. 2008 Sep 25;59(6):932-46. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.004. PMID: 18817732; PMCID: PMC3623689.

Alberi S, Dreifuss JJ, Raggenbass M. The oxytocin-induced inward current in vagal neurons of the rat is mediated by G protein activation but not by an increase in the intracellular calcium concentration. *Eur J Neurosci*. 1997 Dec;9(12):2605-12. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01690.x. PMID: 9517466.

Amato S, Aversa M, Ceccoli C, Gatta E, Candiani S, Pedrazzi M, Capraro M, Maura G, Agnati LF, et al. Heteromerization of Dopamine D2 and Oxytocin Receptor in Adult Striatal Astrocytes. *Int J Mol Sci*. 2023;24:4677. doi:10.3390/ijms24054677.

Amato S, Aversa M, Guidolin D, Pedrazzi M, Pelassa S, Capraro M, Passalacqua M, Bozzo M, Gatta E, Anderlini D, et al. Heterodimer of A2A and oxytocin receptors regulating glutamate release in adult striatal astrocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23:2326. doi:10.3390/ijms23042326.

Armbruster M, Naskar S, Garcia JP, Sommer M, Kim E, Adam Y, Haydon PG, Boyden ES, Cohen AE, Dulla CG. Neuronal activity drives pathway-specific depolarization of peripheral astrocyte processes. *Nat Neurosci*. 2022;25:607–616. doi:10.1038/s41593-022-01049-x.

Bakos J, Srancikova A, Havranek T, Bacova Z. Molecular Mechanisms of Oxytocin Signaling at the Synaptic Connection. *Neural Plast*. 2018;2018:4864107. doi:10.1155/2018/4864107.

Baskerville TA, Douglas AJ. Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther*. 2010;16(3):e92–123. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00154.x.

Baudon A, Grelot V, Wang KY, Althammer F, Denis C, Riché-Piottaix P, Ali AS, Yan Y, Castillo Díaz F, Piacentini F, et al. Stress induces oxytocin-Gαi-dependent remodeling of astrocytes to shape neuronal response in the amygdala. *Nat Commun*. 2025;17:1364. doi:10.1038/s41467-025-68114-4.

Brandebura AN, Paumier A, Onur TS, Allen NJ. Astrocyte contribution to dysfunction, risk and progression in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2023;24:23–39. doi:10.1038/s41583-022-00641-1.

Busnelli M, Gori A, Chini B. Bivalent ligands targeting oxytocin receptor homodimers selectively activate distinct G protein and β-arrestin pathways. *Biochem Pharmacol*. 2026;247:117814. doi:10.1016/j.bcp.2026.117814.

Busnelli M, Saulière A, Manning M, Bouvier M, Galés C, Chini B. Functional Selective Oxytocin-derived Agonists Discriminate between Individual G Protein Family Subtypes. *J Biol Chem.* 2012;287:3617–3629. doi:10.1074/jbc.M111.277178.

Cai H, Li W, Mol BWJ, Liu D, Lei D, Ran X, Zhang D, Xue X, Gao L, Shi J. Randomised, triple-blind, placebo-controlled trial of atosiban in women with previous embryo implantation failure and abnormal uterine contractions undergoing single blastocyst-stage embryo transfer: a study protocol. *BMJ Open.* 2026;16(6):e114029. doi:10.1136/bmjopen-2025-114029.

Castagno AN, Spaiardi P, Trucco A, Maniezzi C, Raffin F, Mancini M, Nicois A, Cazzola J, Pedrinazzi M, Debal Papa P, et al. Oxytocin Modifies the Excitability and the Action Potential Shape of the Hippocampal CA1 GABAergic Interneurons. *Int J Mol Sci.* 2024;25:2613. doi:10.3390/ijms25052613.

Derouiche A, Frotscher M. Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia.* 2001 Dec;36(3):330-41. doi:10.1002/glia.1120. PMID: 11746770.

Farsetti E, Amato S, Averna M, Guidolin D, Pedrazzi M, Maura G, Agnati LF, Cervetto C, Marcoli M. Dual Oxytocin Signals in Striatal Astrocytes. *Biomolecules.* 2025;15:1122. doi:10.3390/biom15081122. PMID: 40867567; PMCID: PMC12383634.

Favero CB, Mandell JW. A pharmacological activator of AMP-activated protein kinase (AMPK) induces astrocyte stellation. *Brain Res.* 2007 Sep 7;1168:1-10. doi:10.1016/j.brainres.2007.06.087. PMID: 17706943; PMCID: PMC2000700.

Froemke RC, Young LJ. Oxytocin, Neural Plasticity, and Social Behavior. *Annu Rev Neurosci.* 2021;44:359–381. doi:10.1146/annurev-neuro-102320-102847.

Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2001;81(2):629–683. doi:10.1152/physrev.2001.81.2.629.

Gottfried C, Cechin SR, Gonzalez MA, Vaccaro TS, Rodnight R. The influence of the extracellular matrix on the morphology and intracellular pH of cultured astrocytes exposed to media lacking bicarbonate. *Neuroscience.* 2003;121(3):553-62. doi:10.1016/S0306-4522(03)00557-8. PMID: 14568017.

Guček A, Vardjan N, Zorec R. Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochem Res.* 2012 Nov;37(11):2351-63. doi:10.1007/s11064-012-0773-6. PMID: 22528833.

Guidolin D, Tortorella C, Marcoli M, Cervetto C, Maura G, Agnati LF. Receptor-Receptor Interactions and Glial Cell Functions with a Special Focus on G Protein-Coupled Receptors. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 12;22(16):8656. doi:10.3390/ijms22168656. PMID: 34445362; PMCID: PMC8395429.

Guidolin D, Tortorella C, Cervetto C, Marcoli M, Maura G, Agnati LF. Interaction Between Oxytocin and Dopamine Signaling: Focus on the Striatum. *Int J Mol Sci.* 2025;26(17):8711. doi:10.3390/ijms26178711.

- Haydon PG, Carmignoto G.** Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev.* 2006;86:1009–1031. doi:10.1152/physrev.00049.2005.
- Jurek B, Neumann ID.** The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. *Physiol Rev.* 2018;98:1805–1908. doi:10.1152/physrev.00031.2017.
- Kuo J, Hariri OR, Micevych P.** An interaction of oxytocin receptors with metabotropic glutamate receptors in hypothalamic astrocytes. *J Neuroendocr.* 2009;21:1001–1006. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01922.x.
- Li X, Ding L, Nie H, Deng DYB.** Calcium Signaling in Astrocytes and Its Role in the Central Nervous System Injury. *Mol Neurobiol.* 2025;62:14947–14965. doi:10.1007/s12035-025-05055-5.
- Liu XY, Ling S, Liu Y, Jiang Y, Wang X, Jia S, Hou C, Li Y, Qiu D, Wang YF.** G Proteins-Associated Dose-Dependent Effects of Oxytocin on Oxytocin Neuronal Activity and Astrocytic Plasticity of the Supraoptic Nucleus. *Mol Neurobiol.* 2025 Dec;62(12):15654–15668. doi:10.1007/s12035-025-05193-w. PMID: 40694283; PMCID: PMC12559076.
- McCarthy KD, de Vellis J.** Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980 Jun;85(3):890–902. doi:10.1083/jcb.85.3.890. PMID: 6248568; PMCID: PMC2111442.
- Meinung CP, Boi L, Pandamooz S, Mazaud D, Ghézali G, Rouach N, Neumann ID.** OXTR-mediated signaling in astrocytes contributes to anxiolysis. *Mol Psychiatry.* 2025;30:2620–2634. doi:10.1038/s41380-024-02870-5.
- Mitre M, Minder J, Morina EX, Chao MV, Froemke RC.** Oxytocin Modulation of Neural Circuits. *Curr Top Behav Neurosci.* 2018;35:31–53. doi:10.1007/7854_2017_7.
- Nedergaard M, Verkhratsky A.** Artifact versus reality—how astrocytes contribute to synaptic events. *Glia.* 2012;60:1013–1023. doi:10.1002/glia.22288.
- Passoni I, Leonzino M, Gigliucci V, Chini B, Busnelli M.** Carbetocin is a Functional Selective Gq Agonist That Does Not Promote Oxytocin Receptor Recycling After Inducing β -Arrestin-Independent Internalisation. *J Neuroendocrinol.* 2016 Apr;28(4):n/a. doi:10.1111/jne.12363. PMID: 26751410; PMCID: PMC5021139.
- Perea G, Navarrete M, Araque A.** Tripartite synapses: Astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009;32:421–431. doi:10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Pirnat S, Božić M, Dolanc D, Horvat A, Tavčar P, Vardjan N, Verkhratsky A, Zorec R, Stenovec M.** Astrocyte arborization enhances Ca^{2+} but not cAMP signaling plasticity. *Glia.* 2021 Dec;69(12):2899–2916. doi:10.1002/glia.24076. PMID: 34406698; PMCID: PMC9290837.
- Porter JT, McCarthy KD.** Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol.* 1997;51:439–455. doi:10.1016/S0301-0082(96)00068-8.
- Raiteri L, Raiteri M.** Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. *Neurochem Res.* 2000 Oct;25(9-10):1265–74.

Reversi A, Rimoldi V, Marrocco T, Cassoni P, Bussolati G, Parenti M, Chini B. The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist" mechanism. *J Biol Chem.* 2005 Apr 22;280(16):16311-8. doi:10.1074/jbc.M409945200. PMID: 15705593.

Rogawski MA, Barker JL. Effects of 4-aminopyridine on calcium action potentials and calcium current under voltage clamp in spinal neurons. *Brain Res.* 1983 Nov 28;280(1):180-5. doi:10.1016/0006-8993(83)91190-3. PMID: 6652477.

Rossi D, Volterra A. Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull.* 2009;80:224–232. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.07.012.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron.* 1994 Sep;13(3):713-25. doi:10.1016/0896-6273(94)90038-8. PMID: 7917301.

Rozen F, Russo C, Banville D, Zingg HH. Structure, characterization, and expression of the rat oxytocin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 3;92(1):200-4. doi:10.1073/pnas.92.1.200. PMID: 7816817; PMCID: PMC42845.

Saura J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation.* 2007 Oct 15;4:26. doi:10.1186/1742-2094-4-26. PMID: 17937799; PMCID: PMC2140055.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012 Jun 28;9(7):676-82. doi:10.1038/nmeth.2019. PMID: 22743772; PMCID: PMC3855844.

Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE. Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990 May;253(2):688-97. PMID: 2338654.

Talpo F, Spaiardi P, Castagno AN, Maniezzi C, Raffin F, Terribile G, Sancini G, Pisani A, Biella GR. Neuromodulatory functions exerted by oxytocin on different populations of hippocampal neurons in rodents. *Front Cell Neurosci.* 2023;17:1082010. doi:10.3389/fncel.2023.1082010.

Tops S, Habel U, Radke S. Genetic and epigenetic regulatory mechanisms of the oxytocin receptor gene (OXTR) and the (clinical) implications for social behavior. *Horm Behav.* 2019 Feb;108:84-93. doi:10.1016/j.yhbeh.2018.03.002. PMID: 29505762.

Vardjan N, Zorec R. Excitable Astrocytes: Ca(2+)- and cAMP-Regulated Exocytosis. *Neurochem Res.* 2015 Dec;40(12):2414-24. doi:10.1007/s11064-015-1545-x. PMID: 25732760.

Wahis J, Baudon A, Althammer F, Kerspern D, Goyon S, Hagiwara D, Lefevre A, Barteczko L, Boury-Jamot B, Bellanger B, et al. Astrocytes mediate the effect of oxytocin in the central amygdala on neuronal activity and affective states in rodents. *Nat Neurosci.* 2021;24:529–541. doi:10.1038/s41593-021-00800-0.

Wang YF, Hatton GI. Mechanisms underlying oxytocin-induced excitation of supraoptic neurons: prostaglandin mediation of actin polymerization. *J Neurophysiol.* 2006;95(6):3933–3947. doi:10.1152/jn.01267.2005.

Wei J, Zheng H, Li G, Chen Z, Fang G, Yan J. Involvement of oxytocin receptor deficiency in psychiatric disorders and behavioral abnormalities. *Front Cell Neurosci.* 2023 Apr 20;17:1164796. doi:10.3389/fncel.2023.1164796. PMID: 37153633; PMCID: PMC???????

Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005 Oct;85(4):1159-204. doi:10.1152/physrev.00003.2005. PMID: 16183910.