



Università degli Studi di Genova

CORSO DI STUDIO IN BIOENGINEERING  
CURRICULUM NEUROENGINEERING AND BIO-ICT

Tesi di Laurea per il conseguimento del titolo di

Dottore Magistrale in Bioengineering

***Verso modelli cerebrali in vitro: dalle  
culture 2D a quelle 3D***

Lorenzo Corsello

data 14/06/23

*Relatore:* Prof.ssa Laura Pastorino

*Relatore:* Prof.ssa Michela Chiappalone

*Correlatore:* Dott. ssa Donatella Di Lisa

# Indice

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLO 1</b>	<b>6</b>
<b>1. BASI DI NEUROFISIOLOGIA E MODELLI SPERIMENTALI</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Sistema nervoso e barriera ematoencefalica</b>	<b>6</b>
1.1.1 Neuroni	7
1.1.2 Astrociti	9
1.1.3 Matrice extracellulare del sistema nervoso centrale	10
1.1.4 Attività Elettrofisiologica Spontanea del Sistema Nervoso Centrale	11
<b>1.2 Modelli di tessuti nervosi <i>in vitro</i></b>	<b>14</b>
1.2.1 Scaffolding	15
1.2.2 Attività Spontanea Neuronale in Vitro	19
<b>CAPITOLO 2</b>	<b>22</b>
<b>2. TOOL PER ANALISI DEI DATI</b>	<b>22</b>
1.3.1 Spycode	22
1.3.2 Spike Analysis	24
1.3.3 Burst Analysis	27
1.3.4 Raster Plot	30
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIALI E METODI SPERIMENTALI</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Coltura di cellule nervose</b>	<b>33</b>
2.1.1 Coltura di astrociti da ratto	33
2.1.2 Colture di cellule staminali pluripotenti indotte di derivazione umana (hiPSCs)	33
2.1.3 Differenziazione hiPSC in neuroni eccitatori	33
2.1.4 Preparazione dell' idrogel di chitosano NeuroGlycoGel	34
2.1.5 Protocollo di preparazione colture neuronali 2D, 3D e 3Dsu2D	35

<b>2.2 Esperimenti di elettrofisiologia per caratterizzazione funzionale</b>	<b>36</b>
2.2.1 Set-up di registrazione	36
2.2.3 Protocollo di registrazione	41
2.2.4 Database e organizzazione dei dati	43
<b>2.3 Esperimenti di Imaging per caratterizzazione morfologica</b>	<b>44</b>
2.3.1 Microscopio in fluorescenza	44
2.3.2 Tecnica di immunofluorescenza	44
<b>CAPITOLO 4</b>	<b>46</b>
<b>4. RISULTATI</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Analisi Qualitativa</b>	<b>46</b>
4.1.1 Campioni 2D	47
4.1.2 Campione 3D	48
4.1.3 Campioni 3Dsu2D	49
<b>4.2 Analisi Quantitativa</b>	<b>51</b>
4.2.1 Campione 2D Rappresentativo	52
4.2.2 Analisi del dataset 2D	58
4.2.3 Campione 3D	64
4.2.4 Campione 3Dsu2D A	70
4.2.5 Campione 3Dsu2D B	76
4.2.6 Campione 3Dsu2D C	82
4.3 Analisi Morfologica	88
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>89</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>91</b>
<b>ESPERIMENTI CON SONDE DA <i>IN VIVO</i></b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>93</b>

# Introduzione

Si stima che i disturbi a carico del sistema nervoso colpiscano più di un miliardo di persone nel mondo (Pai, 2009). Tipici esempi di disturbi nervosi includono lesioni traumatiche acute (es. trauma cranico, lesione del midollo spinale), malattie neurodegenerative (es. malattia di Parkinson, morbo di Alzheimer, malattia di Huntington) o disturbi del neurosviluppo come microcefalia e autismo.

Nella quasi totalità dei casi mancano trattamenti efficaci. La mancanza di modelli sperimentali adeguati che riassumono le complesse interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente *in vivo*, ostacola lo sviluppo di nuovi interventi terapeutici.

La sfida che l'ingegneria biomedica si pone è lo sviluppo di modelli avanzati del sistema nervoso centrale in grado di migliorare la comprensione della neurofisiologia, della patogenesi di malattie neurodegenerative e al contempo esplorare nuove possibili terapie.

Gli studi attuali sulla fisiologia del cervello sono stati in gran parte condotti utilizzando modelli animali *in vivo* o colture cellulari primarie di roditori poste a crescere su substrato bidimensionale (2D). Sebbene questi modelli abbiano fornito una visione approfondita delle complesse interazioni tra i tipi di cellule cerebrali, essi presentano alcuni inconvenienti e differenze fondamentali specifiche con il modello umano.

A livello genomico, ad esempio, nonostante il gran numero di geni ortologhi tra uomo e topo, esistono geni o funzioni di geni associati a varie malattie specifici per l'uomo. A livello cellulare, le differenze tra il cervello umano e quello del topo si trovano, ad esempio, nelle popolazioni di cellule gliali, poiché caratteristiche come il rapporto tra astrociti e neuroni e la complessità degli astrociti sono entrambe nettamente più elevate nel cervello umano.

L'utilizzo di modelli tradizionali *in vitro* di origine animale ha fornito una grande quantità di informazioni sulle cellule neurali; ad esempio la formazione spontanea di reti, siti di attacco cellulare per adesione e migrazione, meccanismi di guida assonale, molecole nel targeting sinaptico ed il potenziale di membrana a riposo di diversi tipi di cellule.

Inoltre, per imitare meglio la complessa connettività presente nel cervello umano, molti sforzi sono stati dedicati alla costruzione di strutture neuronali controllabili *in vitro* con un'architettura tridimensionale (3D).

L'obiettivo principale di questa tesi consiste nello sviluppo e caratterizzazione di reti 2D e 3D *in vitro* formate da neuroni, differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte umane

(human-induced pluripotent stem cell, i.e. h-iPSC), in co-cultura con astrociti corticali di ratto. La coltura 3D è garantita dall'uso di un idrogel biopolimerico termosensibile, in cui sono incapsulate le cellule.

L'attività spontanea delle reti 2D e 3D è stata acquisita in diversi momenti dello sviluppo mediante dispositivi di array di microelettrodi (MEA). È stata valutata ed esplorata la possibilità di utilizzare un sistema di acquisizione basato su sonde, tipicamente utilizzate per le registrazioni *in vivo*, in grado di penetrare il tessuto 3D.

Le attività principali della tesi includono:

- Esperimenti *in vitro*: Esperimenti con colture *in vitro* 2D e 3D di neuroni e astrociti con acquisizioni di attività elettrofisiologica spontanea tramite array di microelettrodi.
- Analisi immagini morfologiche: È stata utilizzata la tecnica dell'immunofluorescenza per marcare e visualizzare i diversi componenti di parte delle colture cellulari e verificare la formazione delle reti.
- Elaborazione dei dati: I dati neuronali sono stati elaborati utilizzando algoritmi in MATLAB.
- Analisi comparativa e interpretazione dei dati: I dati provenienti da colture 2D e 3D sono stati confrontati ed è stato fornito un profilo di sviluppo funzionale per ciascun gruppo sperimentale.

La tesi è organizzata nei seguenti Capitoli:

- Capitolo 1. Basi di Neurofisiologia e Modelli Sperimentali: In cui vengono date alcune basi di neurofisiologia e presentato lo stato dell'arte dei modelli sperimentali.
- Capitolo 2. Tool per Analisi dei Dati: In cui vengono presentati gli strumenti e gli algoritmi utilizzati per l'analisi dei dati.
- Capitolo 3. Materiali e Metodi Sperimentali: In cui vengono presentati i materiali e i metodi utilizzati per la preparazione e caratterizzazione delle colture.
- Capitolo 4. Risultati: In cui vengono presentati e discussi i risultati sperimentali ottenuti, sia per quanto riguarda l'analisi elettrofisiologica che quella morfologica.

Le conoscenze acquisite durante questo progetto aiuteranno a comprendere i fenotipi elettrofisiologici delle colture 2D e 3D e permetteranno di fare un passo avanti verso lo sviluppo di modelli neurali da sfruttare per terapie specifiche per i pazienti.

# Capitolo 1

## 1. Basi di Neurofisiologia e Modelli Sperimentali

### 1.1 Sistema nervoso e barriera ematoencefalica

Il sistema nervoso è uno dei sistemi più importanti e complessi del corpo umano: una rete di cellule, tessuti e organi specializzati che trasmettono segnali elettrici e chimici in tutto il corpo. Questi segnali permettono al corpo di rispondere agli stimoli interni ed esterni, coordinare e controllare varie funzioni e mantenere l'omeostasi.

Il sistema nervoso è suddiviso in due parti principali: il sistema nervoso centrale (SNC) (Figura 1.1 (a)) e il sistema nervoso periferico (SNP) (Figura 1.1 (b)). Il SNC, che è composto dal cervello e dal midollo spinale, è responsabile del processamento e dell'interpretazione delle informazioni ricevute dagli apparati sensoriali, inoltre, controlla le risposte del corpo agli stimoli. Il SNP, d'altra parte, è composto da nervi e gangli e si occupa di trasportare le informazioni dal SNC verso gli organi del corpo e viceversa.

Il cervello, che è l'organo più complesso del corpo, è il principale centro di controllo del sistema nervoso. Riceve, elabora e interpreta le informazioni ricevute dai sensi e quindi invia comandi al resto del corpo attraverso la spina dorsale (o midollo spinale). Il midollo spinale, che è un lungo e delicato tubo di tessuto nervoso che va dalla base del cervello fino alla parte bassa della schiena, funge da stazione di relay per i segnali in transito verso e dal cervello.

Il SNP è ulteriormente suddiviso in due sottosistemi: il sistema nervoso somatico e quello autonomo. Il sistema nervoso somatico controlla i movimenti e le sensazioni volontarie del corpo, come i movimenti degli arti e la sensazione del tatto. Il sistema nervoso autonomo, d'altra parte, controlla le funzioni involontarie del corpo, come la frequenza cardiaca, la digestione e la respirazione.

Il sistema nervoso svolge un ruolo cruciale nella manutenzione dell'omeostasi, che è l'equilibrio delle condizioni interne del corpo. Lo fa continuamente monitorando l'ambiente interno ed esterno del corpo e apportando le modifiche necessarie. Ad esempio, il sistema nervoso regola

la temperatura corporea, la pressione sanguigna e la frequenza cardiaca per garantire che rimangano entro un intervallo normale.

In generale, il sistema nervoso è un sistema incredibilmente complesso, ma per gli obiettivi di questa tesi basterà soffermarsi su neuroni, astrociti e matrice extracellulare.

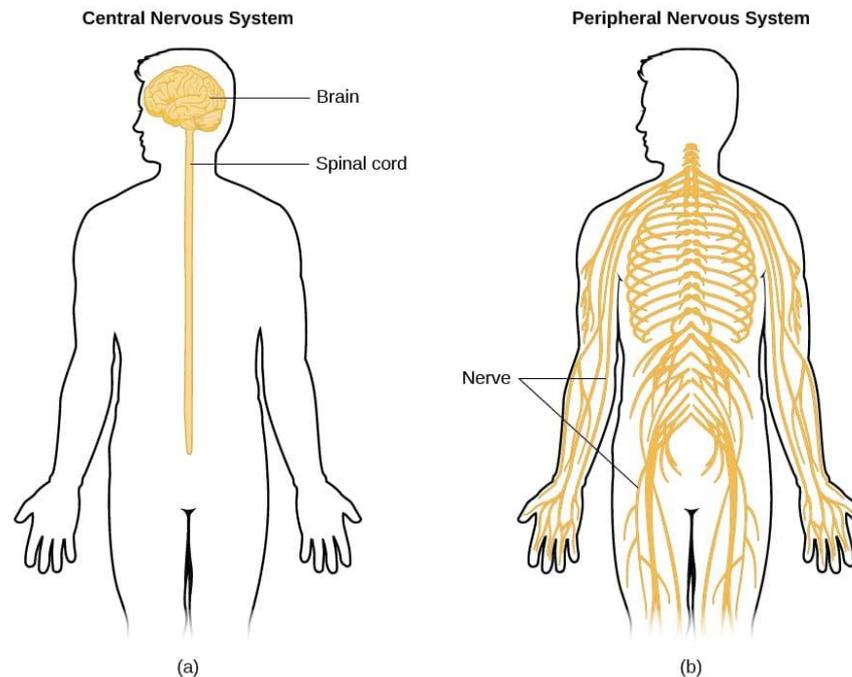


Figure 1.1 (a) Sistema Nervoso Centrale, (b) Sistema Nervoso Periferico

### ***1.1.1 Neuroni***

I neuroni sono le unità funzionali del sistema nervoso, essi sono responsabili della generazione e della trasmissione degli impulsi elettrici, noti come potenziali d'azione.

#### **Struttura dei Neuroni**

I neuroni sono composti da tre componenti principali (Figura 1.2): il corpo cellulare (soma), le estensioni citoplasmatiche chiamate dendriti e un'ulteriore estensione denominata assone. Il corpo cellulare contiene il nucleo e altre componenti cellulari essenziali per il funzionamento del neurone. I dendriti si ramificano dal corpo cellulare e ricevono segnali provenienti da altri neuroni o da cellule sensoriali. L'assone è un'unica e lunga estensione che trasmette i segnali in uscita dal neurone verso altri neuroni o verso gli organi effettori. (Bear et al., 2015)

#### **Sinapsi**

Le sinapsi sono le giunzioni specializzate tra l'assone di un neurone, chiamato terminale sinaptico, e il dendrite o il soma di un altro neurone. La comunicazione tra neuroni avviene attraverso queste sinapsi. Esistono due tipi principali di sinapsi: elettriche e chimiche. Le

sinapsi elettriche consentono il passaggio diretto dei segnali elettrici tra neuroni attraverso gap junctions. Al contrario, le sinapsi chimiche coinvolgono la trasmissione di segnali chimici chiamati neurotrasmettitori. (Shepherd, 2004)

### **Neurotrasmettitori**

I neurotrasmettitori sono molecole chimiche coinvolte nella trasmissione del segnale tra neuroni. Possono essere classificati come neurotrasmettitori eccitatori o inibitori a seconda degli effetti che hanno sulla cellula postsinaptica. Alcuni esempi di neurotrasmettitori eccitatori includono il glutammato, l'acetilcolina e l'adrenalina, mentre il GABA e la glicina sono esempi di neurotrasmettitori inibitori. (Boyle, 2005)

### **Glutammato**

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio nel sistema nervoso centrale. Svolge un ruolo chiave nell'apprendimento, nella memoria e nella trasmissione dei segnali sensoriali. Il glutammato agisce legandosi ai recettori del glutammato sulla membrana postsinaptica, come i recettori NMDA (N-metil-D-aspartato) e i recettori AMPA ( $\alpha$ -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo propionato), causando una depolarizzazione della cellula bersaglio. (Mayer, 2005)

### **GABA**

L'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA) è il principale neurotrasmettitore inibitorio nel sistema nervoso centrale. Il GABA agisce legandosi ai recettori del GABA sulla membrana postsinaptica e induce un'iperpolarizzazione della cellula bersaglio, riducendo la probabilità di generare un potenziale d'azione. Il GABA svolge un ruolo fondamentale nel controllo del tono muscolare, nella regolazione del sonno e dell'ansia. (Petroff, 2002)

### **Plasticità Sinaptica**

La plasticità sinaptica si riferisce alla capacità delle sinapsi di cambiare la loro forza e la loro efficienza nel tempo. La plasticità sinaptica è alla base dei processi di apprendimento e memoria nel cervello. La plasticità sinaptica a breve termine agisce su una scala temporale da decine di millisecondi a pochi minuti a differenza della plasticità a lungo termine, che dura da minuti a ore. Un importante meccanismo di plasticità sinaptica è la plasticità a lungo termine, classificata in potenziamento a lungo termine (LTP) e depressione a lungo termine (LTD). La LTP è un aumento a lungo termine dell'efficienza sinaptica, mentre la LTD è una riduzione a

lungo termine dell'efficienza sinaptica. Questi processi dipendono dalla modulazione dei neurotrasmettitori e dal rafforzamento o indebolimento delle sinapsi. (Malenka & Bear, 2004)

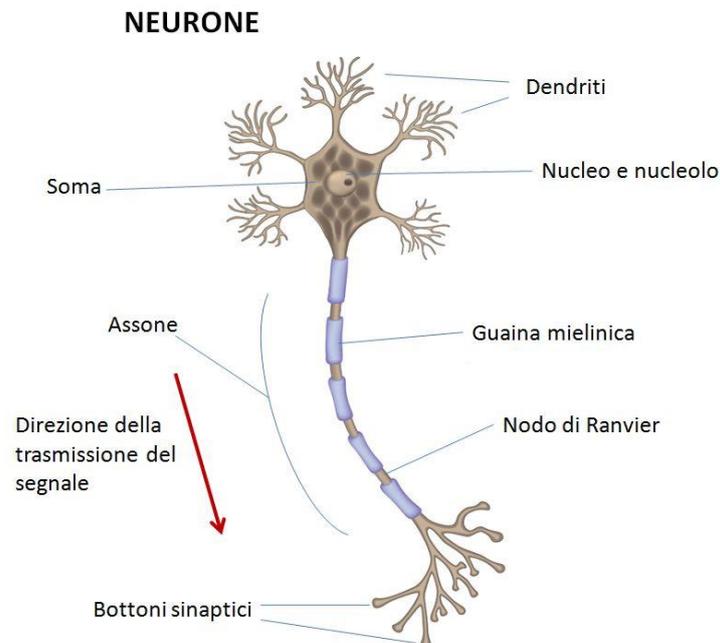


Figure 1.2 Rappresentazione schematica di un neurone

### 1.1.2 *Astrociti*

Il ruolo primario degli astrociti (Figura 1.3) è quello di fornire supporto strutturale e funzionale ai neuroni, di regolare i livelli dei neurotrasmettitori extrasinaptici e di modulare passaggi specifici nella formazione e plasticità delle sinapsi (Freeman, 2010).

Gli astrociti e i neuroni sono in un costante meccanismo di comunicazione a feedback attraverso rilascio di neurotrasmettitori, come il GABA ed il glutammato, che modulano la trasmissione sinaptica e il comportamento elettrochimico di entrambi i tipi di cellule. Il gruppo interconnesso di un neurone pre e post-sinaptico e dell'astrocita è indicato come sinapsi tripartita (Araque et al., 1999). L'attività di sparo neuronale induce il rilascio di glutammato e acido  $\gamma$ -amminobutirrico dai neuroni pre-sinaptici (Mayorquin et al., 2018; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Quando il glutammato si lega ai recettori metabotropici del glutammato (mGluR) sulla membrana cellulare astrocitica, una cascata di reazioni chimiche provoca il rilascio del secondo messaggero inositolo trifosfato (IP3), che innesca a sua volta il rilascio intracellulare di  $[Ca^{2+}]$  (Bazargani & Attwell, 2016). L'aumento di  $[Ca^{2+}]$ , suscitato dall'assorbimento di glutammato o GABA, può provocare il rilascio di gliotrasmettitori che regolano la trasmissione sinaptica e la plasticità sinaptica dei neuroni (Araque et al., 1999).

Gli astrociti non sono proliferativi nel normale cervello adulto, tuttavia, in caso di lesione, queste cellule possono essere attivate. Le cellule astrocitarie vengono attivate in determinate condizioni patologiche che possono essere identificate da un alto livello di espressione della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) (Gomi et al., 2010; Li et al., 2008).

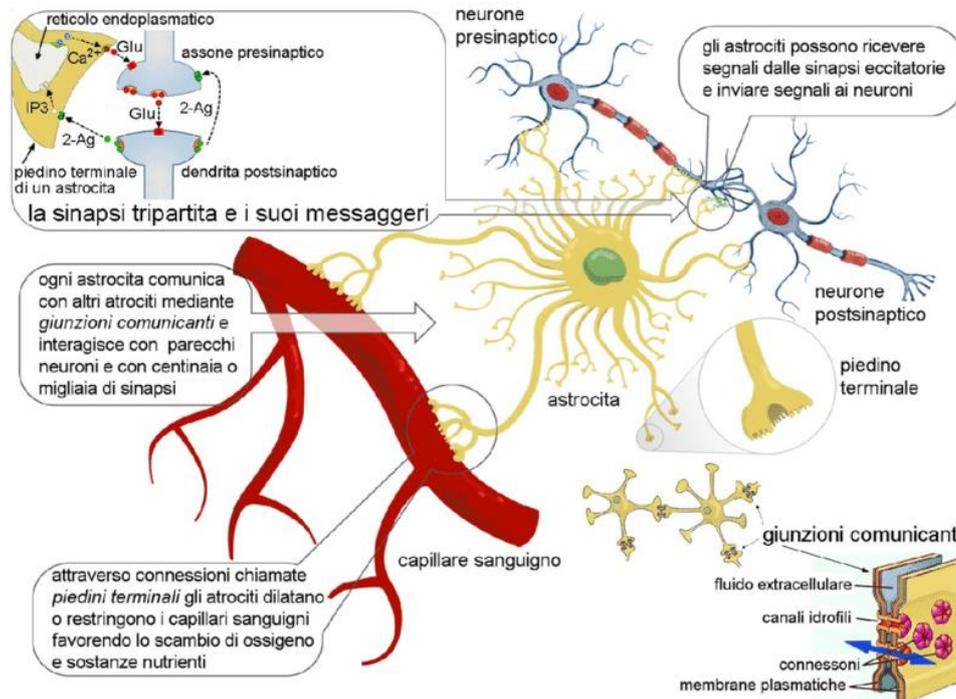


Figure 1.3 Rappresentazione schematica di un astrocita e delle sue principali proprietà. (Nobili, Renato. (2015). La macchina della mente. II - Il ruolo della sincronizzazione nel funzionamento del cervello.)

### 1.1.3 Matrice extracellulare del sistema nervoso centrale

Il sistema nervoso centrale è formato in prevalenza da cellule e vasi sanguigni e per la parte rimanente (15-25% del volume) da spazio extracellulare che per il 20 % è costituito dalla matrice extracellulare (Extra Cellular Matrix ECM) (Nicholson & Syková, 1998).

La matrice extracellulare del sistema nervoso centrale (Figura 1.4) influenza la proliferazione, la differenziazione, la migrazione e la maturazione cellulare durante lo sviluppo del cervello.

La composizione della matrice extracellulare nel sistema nervoso è particolare: A differenza delle matrici extracellulari di altri tessuti, la matrice extracellulare nativa del cervello presenta un microambiente complesso composto principalmente da acido ialuronico, proteoglicani, tenascine, proteine di collegamento, laminine, fibronettine e collagene (Novak & Kaye, 2000).

Oltre a fungere da supporto strutturale per le cellule, la matrice extracellulare fornisce anche segnali estrinseci per regolare il comportamento cellulare. In particolare, la proprietà

meccanica dell'ECM è un parametro essenziale che deve essere considerato quando si progettano surrogati tissutali in vitro, i tessuti neuronali possiedono proprietà biofisiche molto distinte, come basso modulo elastico, molto inferiore al cuore, alla cartilagine e alle ossa.

Numerose evidenze (Engler et al., 2006; Georges & Janmey, 2005) hanno dimostrato che la rigidità della matrice suscita effetti rilevanti sulle morfologie e sui comportamenti cellulari, in particolare, è probabile che le cellule staminali nervose si differenzino in cellule della glia quando incorporate in matrici con modulo più elevato (<1 kPa), mentre i gel più morbidi (100-500 Pa) tendono a migliorare la migrazione cellulare e la differenziazione in neuroni.

Allo stesso modo, la porosità della matrice influenza notevolmente la migrazione cellulare e l'efficienza metabolica, ad esempio, le grandi dimensioni dei pori (più di 100  $\mu\text{m}$ ) e una migliore interconnettività hanno migliorato lo scambio di nutrienti; una corretta dimensione dei pori, simile a quella dei tessuti nativi, porta a una migliore migrazione cellulare.

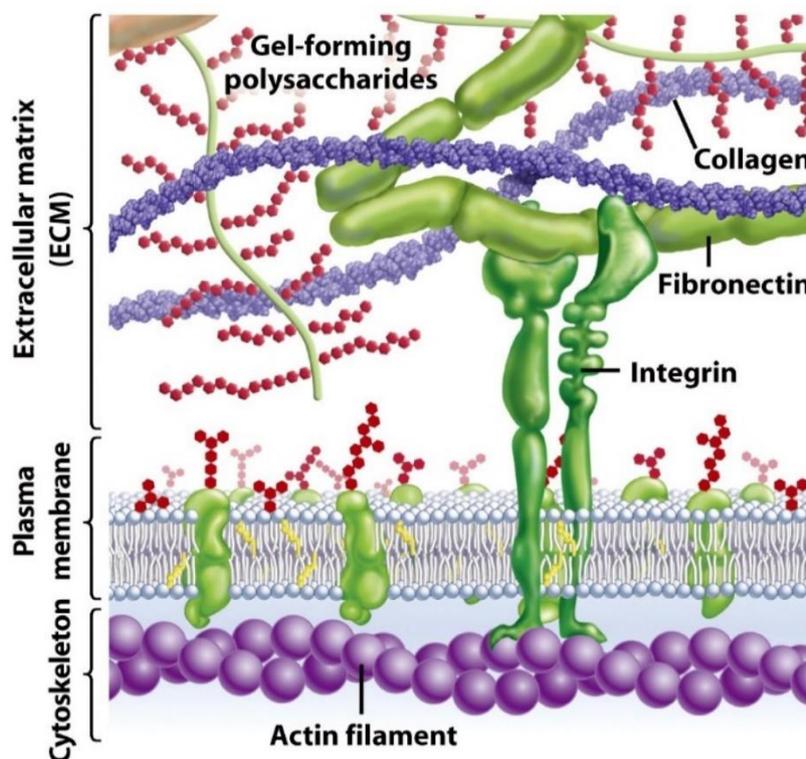


Figure 1.4 Rappresentazione schematica della matrice extracellulare

#### ***1.1.4 Attività Elettrofisiologica Spontanea del Sistema Nervoso Centrale***

L'attività spontanea del SNC può essere suddivisa in due categorie principali: l'attività di fondo e l'attività spontanea sincronizzata.

## **Attività di fondo**

L'attività di fondo è l'attività spontanea, continua e irregolare del SNC in assenza di stimoli esterni. Questa attività è caratterizzata da potenziali d'azione a bassa frequenza, in genere tra 1 e 10 Hz, che si verificano in modo casuale in diverse regioni del cervello. Questa attività è presente in tutte le regioni del SNC e può essere registrata *in vivo* e *in vitro*. L'attività di fondo è stata osservata in tutti i vertebrati, dai pesci ai mammiferi, compreso l'uomo (Hughes et al., 2002).

## **Attività spontanea sincronizzata**

L'attività spontanea sincronizzata è l'attività spontanea in cui i neuroni di una particolare regione del cervello si attivano simultaneamente in modo sincronizzato. Questo tipo di attività è presente in diverse regioni del cervello e può essere registrato sia *in vivo* che *in vitro*. L'attività spontanea sincronizzata si verifica ad una frequenza più alta rispetto all'attività di fondo e può essere suddivisa in tre categorie principali: le oscillazioni di campo locale, le onde lente e le oscillazioni di alta frequenza (Buzsáki, 2006).

### *Oscillazioni di campo locale*

Le oscillazioni di campo locale (LFP, Local Field Potential) sono oscillazioni di bassa frequenza (0,1-200 Hz) registrate dall'elettrodo di registrazione come una somma degli eventi elettrici dei neuroni circostanti (Buzsáki, 2006). Queste oscillazioni si verificano in diverse regioni del cervello e possono essere suddivise in diverse bande di frequenza, tra cui delta (1-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (12-30 Hz) e gamma (30-100 Hz) (Buzsáki, 2006). Le oscillazioni di campo locale sono associate a diversi stati fisiologici e comportamentali, tra cui il sonno, la veglia e la cognizione (Buzsáki, 2006).

### *Onde lente*

Le onde lente (slow waves) sono oscillazioni di bassa frequenza (0,5-4 Hz) registrate in diverse regioni del cervello, tra cui il cervello anteriore e il cervello posteriore (Steriade et al., 1993). Queste onde sono caratterizzate da un periodo di iperpolarizzazione seguito da un periodo di depolarizzazione che porta alla generazione di potenziali d'azione. Le onde lente sono tipicamente osservate in diverse fasi del sonno, in particolare nel sonno lento profondo (NREM) (Mölle et al., 2002), ma sono anche presenti durante la veglia e possono essere osservate in animali anestetizzati (Steriade et al., 1993). Le onde lente hanno una funzione importante nella consolidazione della memoria, poiché si sono dimostrate essenziali per la formazione della memoria a lungo termine (Diekelmann & Born, 2010).

### *Onde theta*

Le onde theta sono oscillazioni di bassa frequenza (4-8 Hz) che sono presenti in diverse regioni del cervello, tra cui l'ippocampo e la corteccia prefrontale mediale. Queste onde sono spesso associate all'attività in stato di veglia e si registrano durante la navigazione spaziale e la memoria episodica (Buzsáki, 2002). Inoltre, le onde theta sono state osservate durante il sonno REM e durante l'esplorazione di nuovi ambienti da parte di animali (Buzsáki, 2002).

### *Attività epilettiforme*

L'attività epilettiforme è un tipo di attività spontanea che si verifica quando i neuroni del cervello generano scariche sincrone e anomale di potenziali d'azione. Questa attività può essere osservata in pazienti affetti da epilessia e in modelli animali di epilessia (Avoli et al., 2002). L'attività epilettiforme può essere di diversi tipi, tra cui le scariche spike-and-wave che si verificano durante le crisi epilettiche generalizzate, e le scariche parossistiche che si verificano in determinate regioni del cervello durante le crisi epilettiche focali (Avoli et al., 2002)

## **Regolazione dell'attività spontanea**

L'attività spontanea del SNC è regolata da diversi meccanismi, tra cui l'equilibrio tra l'eccitazione e l'inibizione sinaptica, la plasticità sinaptica, l'attività di modulatori neuromodulatori e i ritmi circadiani.

### *Equilibrio tra l'eccitazione e l'inibizione sinaptica*

L'eccitazione e l'inibizione sinaptica sono gli elementi costitutivi dell'attività spontanea del SNC. L'eccitazione è mediata dall'azione dei neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato sui recettori ionotropici, mentre l'inibizione è mediata dall'azione dei neurotrasmettitori inibitori come GABA e glicina sui recettori ionotropici (Roth & Draguhn, 2012). L'equilibrio tra l'eccitazione e l'inibizione sinaptica è fondamentale per regolare l'attività spontanea del SNC e prevenire l'insorgenza di patologie come l'epilessia.

### *Plasticità sinaptica*

La plasticità sinaptica è un meccanismo fondamentale per la regolazione dell'attività spontanea del SNC, poiché permette alle connessioni neuronali di adattarsi a variazioni nell'input sensoriale e nell'esperienza. La plasticità si declina in due classi principali: plasticità sinaptica a breve termine, e plasticità sinaptica a lungo termine. La plasticità sinaptica a breve termine

agisce su una scala temporale da decine di millisecondi a pochi minuti a differenza della plasticità a lungo termine, che dura da minuti a ore.

In particolare, la plasticità sinaptica a lungo termine può essere classificata in due tipi: il potenziamento a lungo termine (long-term potentiation, LTP) e la depressione a lungo termine (long-term depression, LTD) (Bear & Malenka, 1994).

La LTP è un processo di potenziamento della forza sinaptica che si verifica dopo una ripetizione di stimolazione a frequenza elevata. Questo fenomeno è stato descritto per la prima volta nel 1973 da Bliss e Lomo (Bliss & Lomo, 1973) ed è stato successivamente identificato in diverse regioni del cervello, tra cui l'ippocampo (Bliss & Collingridge, 1993). La LTP è mediata da diversi meccanismi, tra cui l'attivazione dei recettori NMDA (N-metil-D-aspartato), che porta all'ingresso di ioni calcio nelle cellule postsinaptiche e all'attivazione di segnali di trasduzione intracellulari (Bear & Malenka, 1994). La LTP è stata implicata in diversi processi cognitivi, tra cui l'apprendimento e la memoria (Whitlock et al., 2006).

La LTD, d'altra parte, è un processo di riduzione della forza sinaptica che si verifica dopo una ripetizione di stimolazione a frequenza bassa. Anche la LTD è stata descritta in diverse regioni del cervello e può essere mediata da diversi meccanismi, tra cui l'attivazione dei recettori metabotropici per il glutammato (mGluR) e la conseguente riduzione dell'attività postsinaptica (Bear & Malenka, 1994). La LTD è stata implicata in diversi processi, tra cui la depressione e l'eliminazione di memorie non necessarie (Dudek & Bear, 1992).

Inoltre, la plasticità sinaptica è anche modulata da fattori epigenetici, come l'acetilazione degli istoni e la metilazione del DNA (Day & Sweatt, 2011). Questi meccanismi possono influenzare l'espressione dei geni coinvolti nella plasticità sinaptica e regolare l'efficacia delle sinapsi.

## **1.2 Modelli di tessuti nervosi *in vitro***

Lo studio dei neuroni, tramite colture *in vitro*, è stato condotto per la prima volta nel 1907 grazie al contributo di Ross Harrison (Harrison et al., 1907) che, attraverso la coltura tissutale, ha mantenuto in vita gli espianti di tessuto al di fuori dell'animale osservando in particolare lo sviluppo delle cellule nervose. I modelli *in vitro* possono suddividersi in colture bidimensionali (2D) e tridimensionali (3D).

La coltura 2D prevede l'adesione e la crescita delle cellule su un monostrato di vetro (vetrini, dispositivi di array di microelettrodi) o, più comunemente, su plastica in polistirene (piastre di Petri, fiasche) per colture tissutali. Lo svantaggio principale di questa tecnica è che non si

riescono a replicare le interazioni tridimensionali cellula-ECM che normalmente avvengono *in vivo*.

Per superare questo limite sono state introdotte nel 1980 le colture 3D, con lo scopo di mimare meglio l'ambiente cellulare *in vivo*. Questa tecnica prevede la crescita delle cellule in uno scaffold/matrice tridimensionale o immerse in un mezzo in sospensione sotto forma di aggregati/sferoidi 3D (Chaicharoenaudomrung et al., 2019).

Un ulteriore passo in avanti, nello sviluppo di modelli affidabili, è stato rappresentato dall'introduzione delle cellule staminali pluripotenti di derivazione umana (hPSC). Queste cellule sono in grado di auto rinnovarsi e differenziarsi in tutti e tre gli strati germinali: l'endoderma, il mesoderma e l'ectoderma. Le hPSC sono suddivise in cellule staminali embrionali umane (hESC) e cellule staminali pluripotenti indotte dall'uomo (hiPSC). La differenziazione neurale delle hPSC è stata descritta per la prima volta nel 2001 e da allora, sono stati pubblicati un vasto numero di protocolli di differenziazione che dirigono lo sviluppo delle hPSC verso cellule neurali (Carpenter et al., 2001; Reubinoff et al., 2001).

Al fine di studiare il sistema nervoso, le colture neuronali necessitano dell'utilizzo di componenti della matrice extracellulare, come ad esempio laminina, fibronectina, poliornitina, o di altri fattori di adesione, come polimeri naturali tra cui il chitosano, il quale è risultato molto efficace per la crescita neuritica *in vitro* (Di Lisa et al., 2022; Hagg et al., 1989; Hatten et al., 1982).

### **1.2.1 Scaffolding**

Il concetto di "scaffolding" in relazione alla coltura di neuroni *in vitro*, si riferisce all'utilizzo di una struttura di supporto per guidare e formare la crescita e l'organizzazione delle cellule neurali in un ambiente di laboratorio. Ciò può includere l'uso di componenti della matrice extracellulare (ECM), come laminina, acido ialuronico e collagene, materiali sintetici come il polietilene glicole (PEG) e il poli-L-lisina (PLL), materiali naturali come chitosano e alginato e semi-sintetici come gelatina metacrilate (GELMA) o acido ialuronico metacrilato (HAMA)

Lo scaffold fornisce l'ambiente adatto affinché le cellule siano in grado di svolgere efficacemente i loro compiti come adesione, proliferazione e differenziazione.

Per svolgere queste varie funzioni nell'ingegneria tissutale, lo scaffold deve soddisfare i seguenti requisiti:

- Biocompatibilità,
- Biodegradabilità

- Non tossicità e non immunogenicità.
- Porosità e morfologia adeguate per il trasporto di cellule, gas, metaboliti, nutrienti e molecole segnale sia all'interno dello scaffold che tra lo scaffold e l'ambiente circostante.

In questo contesto, l'idrogelo a base di chitosano è considerato un buon candidato per un ampio spettro di applicazioni poiché possiede proprietà biologiche uniche tra cui biotività, biocompatibilità, biodegradabilità, non tossicità, inerzia fisiologica, proprietà antibatteriche, emostatiche, fungistatiche e antitumorali.

### **1.2.1.1 Idrogeli**

Gli idrogeli (Figura 1.5) sono reti polimeriche tridimensionali, in grado di assorbire e trattenere grandi quantità di acqua (> 90%) (Buwalda et al., 2014).

Comunemente gli idrogeli sono caratterizzati da: (1) legami idrogeno, (2) interazioni elettrostatiche, (3) interazioni idrofobiche, (4) legami idrogeno mediati dall'acqua, (5) interazioni di van der Waals, (6) reticolazioni covalenti o (7) una combinazione delle interazioni sopracitate (Guan et al., 2017).

Gli idrogel forniscono sistemi ideali di "materiale soft" per imitare i microambienti nativi della matrice extra-cellulare grazie alle loro proprietà di biocompatibilità, meccanica e degradazione (Geckil et al., 2010; Tibbitt & Anseth, 2009).

Inoltre, sono in grado di incorporare facilmente segnali bioattivi o altre strutture biomolecolari come gli acidi nucleici, gli acidi grassi, i glicani e fattori di crescita per formare scaffolds biomimetici (Prince & Kumacheva, 2019).

L'impiego di idrogeli come matrici extracellari artificiali può rivelarsi particolarmente vantaggioso poiché forniscono un ambiente tridimensionale simile a quello presente *in vivo* e possono essere modificati per adattarsi alle esigenze specifiche della ricerca. Ciò può essere particolarmente utile per studiare lo sviluppo di reti neurali, nonché per applicazioni nell'ingegneria tissutale neurale e nella medicina rigenerativa.

Date le loro proprietà e la loro fabbricazione versatile, gli idrogeli sono stati applicati in una vasta gamma di applicazioni biomediche e ingegneristiche comprese l'ingegneria tissutale e la medicina rigenerativa.

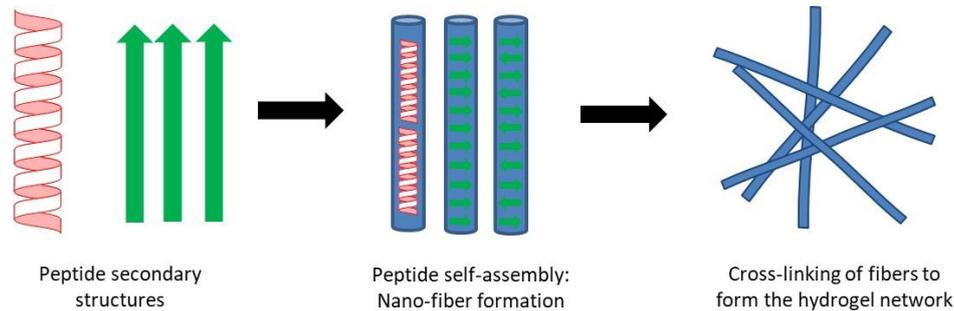


Figure 1.5 Schema del processo di autoassemblamento degli idrogel

### 1.2.1.2 Chitosano

Dopo la cellulosa, la chitina è sicuramente uno dei biopolimeri più abbondanti in natura essendo uno dei componenti principali dall'esoscheletro dei crostacei ma anche il principale costituente della parete cellulare negli artropodi e nei funghi.

Dal punto di vista chimico si tratta di un polisaccaride costituito da più unità di acetilglucosamina (più specificamente, N-acetil-D-glucos-2-ammina) legate tra di loro con un legame di tipo  $\beta$ -1,4, lo stesso delle unità di glucosio che formano la cellulosa. Strutturalmente è identica alla cellulosa con la sostituzione di ogni gruppo idrossile su ogni monomero con un gruppo ammidico (Figura 1.6 (a)).

La lavorabilità della chitina e il suo impiego sono fortemente limitati a causa della scarsa solubilità in soluzione acquosa e in molti solventi organici dovuto al suo alto grado di cristallinità (Hirano, 1996). Per essere utilizzata convenientemente in campo biomedico e farmaceutico, dopo l'estrazione, deve essere trasformata nella sua forma deacetilata mediante l'impiego di idrossido di sodio o di potassio: il chitosano (Figura 1.6 (b)) (No & Meyers, 1995).

Durante il processo di deacetilazione, il gruppo acetile ( $-\text{COCH}_3$ ) presente nella chitina lascia spazio al gruppo amminico ( $-\text{NH}_2$ ) nel chitosano. Il grado di deacetilazione è definito come il numero di gruppi amminici lungo la catena: per considerarla chitosano, una chitina deve avere un grado di deacetilazione superiore al 60%. Le diverse tipologie di chitosano dunque sono definibili in base al grado di deacetilazione e alla fonte di provenienza.

Il peso molecolare del chitosano (Molecular Weight, MW) è un importante parametro di classificazione che è stato convenuto in tre classi diverse in base al MW: Low-Molecular-Weight (LMW), Medium-Molecular-Weight (MMW) e High-Molecular-Weight (HMW).

Nel mondo diversi milioni di tonnellate di chitina vengono raccolte ogni anno, la facile reperibilità unita al basso costo del materiale, rendono il chitosano di grande interesse anche per un possibile “scale up” industriale delle scoperte sviluppate in ambito di ricerca di base.

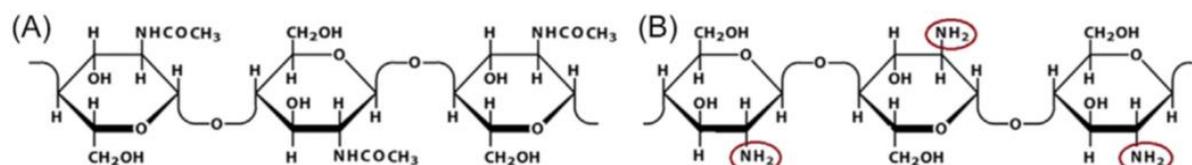


Figure 1.6 Struttura chimica della chitina (A) e del chitosano (B)

### ***Proprietà del chitosano***

Il grado di deacetilazione (DD) ottenuto, in seguito alla lavorazione della chitina, influenza le proprietà del chitosano. Il DD è il fattore che influenza le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche del chitosano (Rodríguez-Vázquez et al., 2015).

La solubilità del chitosano dipende dalla distribuzione dei gruppi ammino e N-acetil liberi: a  $\text{pH} < 6.5$  (soluzioni acide) i gruppi amminici liberi sono protonati e conferiscono un comportamento policationico e la molecola diventa solubile; a  $\text{pH} \geq 6.5$  i gruppi amminici tendono a deprotonarsi e la soluzione di chitosano diventa insolubile in acqua (Kim et al., 2008).

Il chitosano è un ottimo candidato per applicazioni biomedicali in quanto è caratterizzato da una bassa tossicità, bioattività e proprietà mucoadesive, oltre ad avere forti proprietà antibatteriche nella formulazione a basso peso molecolare (Bano et al., 2017). Inoltre, questo copolimero ha le caratteristiche di essere: biodegradabile, biocompatibile e solubile in soluzione acquosa. La biocompatibilità stessa dipende dal grado di deacetilazione: è stato dimostrato che maggiore è il DD, maggiore sarà la bioaffinità del materiale (Prasitsilp et al., 2000).

La superficie di questo biomateriale è carica positivamente e idrofilica e ciò favorisce l'adesione, la proliferazione e la differenziazione cellulare (Figura 1.7) (Mota et al., 2012). Più nello specifico, è stato dimostrato l'uso del chitosano come fattore di adesione e scaffold per colture neuronali sia 2D che 3D (Di Lisa et al., 2020).

Per tutte queste proprietà, l'utilizzo del chitosano negli ultimi vent'anni è aumentato drasticamente nell'ingegneria tissutale e nella medicina rigenerativa (Victor et al., 2020). L'utilizzo del chitosano come biomateriale è stato approvato da Food and Drug Administration (FDA) per applicazioni in device biomedicali, nello specifico in drug delivery e in ingegneria tissutale, con l'obiettivo di ripristinare la funzionalità di tessuti danneggiati (De Masi et al.,

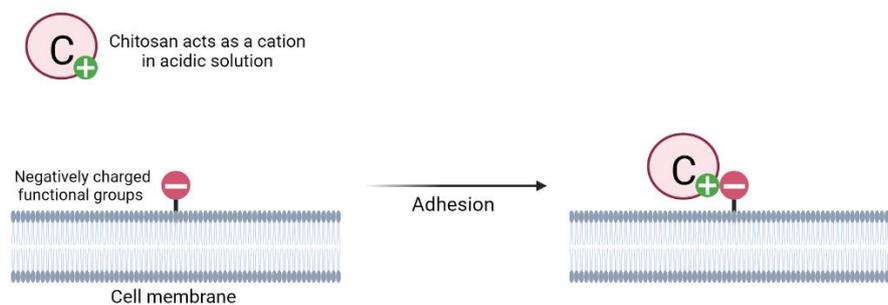


Figure 1.7 Processo di adesione membrana cellulare-chitosano

2019).

### ***1.2.2 Attività Spontanea Neuronale in Vitro***

Il potenziale di azione (Figura 1.8) è l'evento fondamentale dell'attività elettrica dei neuroni, rappresentato da rapidi cambiamenti del potenziale di membrana della durata complessiva di circa 2 millisecondi. Questo impulso elettrico svolge un ruolo fondamentale nella comunicazione cellulare, esso è un evento stereotipato in grado di trasportare messaggi anche a lunga distanza trasmettendosi da una cellula ad un'altra. Ciascun potenziale d'azione è dunque un'alterazione del potenziale di membrana a riposo (-70mV per i neuroni) e se ne possono identificare diverse fasi:

- **Depolarizzazione:** a seguito di uno stimolo vengono aperti i canali per il sodio voltaggio-dipendenti ed il potenziale di membrana sale sino ad un valore di soglia di circa -55mV. Qualsiasi stimolo che non è in grado di superare questo valore di soglia non genererà alcun potenziale di azione. Superata la soglia segue l'apertura di altri canali sodio con il raggiungimento di un potenziale di membrana di +40mV.

- Ripolarizzazione: raggiunto il picco di depolarizzazione la permeabilità per il sodio diminuisce mentre aumenta quella per il potassio, ripolarizzando la membrana verso valori negativi.
- Iperpolarizzazione: la ripolarizzazione effettuata dai canali per il potassio non è ostacolata da quelli per il sodio che al momento sono chiusi, questo comporta che il potenziale di membrana si assesti al valore di quello del potassio di circa  $-90\text{mV}$ . Con il diminuire della permeabilità per il sodio la pompa sodio-potassio, attraverso il consumo di ATP, ripristina il potenziale riportandolo a quello in condizioni di riposo.

Quando i neuroni iniziano a sviluppare connessioni sinaptiche si definiscono anche circuiti funzionali, portando alla produzione di eventi spontanei guidati dalla rete, che coinvolgono grandi popolazioni neuronali.

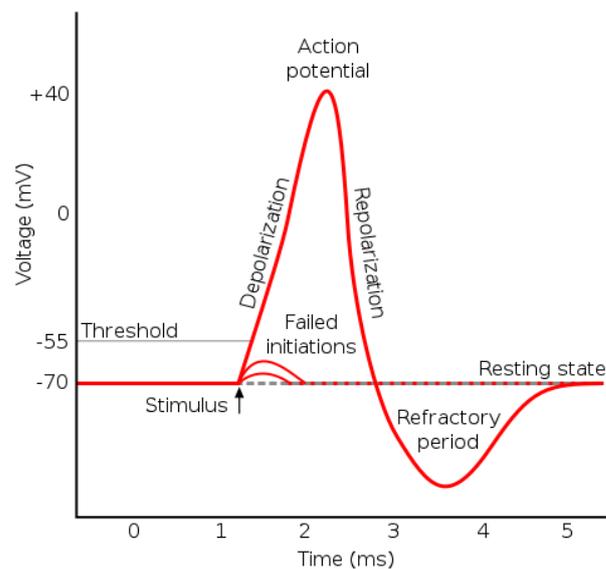


Figure 1.8 Rappresentazione schematizzata di un potenziale di azione neuronale

Anche i neuroni coltivati in vitro costituiscono network dando origine ad una attività elettrica spontanea (Chiappalone et al., 2006). Tale attività può assumere natura differente e si modifica durante la maturazione della rete:

- **Spiking**: nella prima settimana di coltura si avrà un'attività sotto forma di spike, ovvero i potenziali d'azione di singole cellule, tra loro non correlati, presentando diverse irregolari frequenze di sparo.

- **Bursting:** a partire dalla seconda gli spike tenderanno a raggrupparsi in burst costituiti da una rapida sequenza di almeno cinque spike ravvicinati nel tempo (Figura 1.9). Ciascun burst può arrivare a durare dalle centinaia di millisecondi fino anche a secondi.
- **Network burst:** l'attività di rete espressa dai network burst si verifica solamente nelle reti che hanno raggiunto la maturità, stimata a circa 28 giorni in coltura per i modelli 2D (Tukker et al., 2016). L'attività di burst sincronizzata è costituita da una produzione collettiva che comprende tutta la rete di potenziali di azione ravvicinati, formando eventi di burst sincroni intervallati da periodi di quiete con una bassissima o nulla presenza di spike. L'attività di burst collettivo di rete è importante per processi cognitivi ed in vivo è stata riscontrata durante il sonno.

È comunemente accettato che, per indagare e comprendere il codice neurale, è necessario concentrarsi principalmente sull'attività elettrica basata su gruppi di spike o burst (Marom & Shahaf, 2002). Essi sono generati da un singolo neurone o da una popolazione di neuroni che sparano in modo sincrono e si formano e cambiano durante lo sviluppo in modo dinamico e legato all'esperienza (Quartz & Sejnowski, 1997).

Il numero e la morfologia dei segnali di spike e burst cambiano in base all'età della rete (Chiappalone et al., 2006).

Un'altra componente che agisce sull'attività neuronale è la presenza o meno di astrociti. Essi svolgono un ruolo importante nella regolazione dello sviluppo dei neuroni e hanno anche dimostrato di migliorare lo sviluppo delle reti neuronali e dei potenziali d'azione nelle co-culture umane derivate da iPSC (Tang et al., 2013). È stato anche riportato che l'aggiunta di astrociti al modello neuronale aumenta la sincronia delle reti (Amiri et al., 2013). Inoltre, l'inclusione di astrociti aggiunge anche obiettivi specifici e fisiologicamente rilevanti per interazioni, tossiche o non, con la coltura che non sarebbero presenti in un modello neuronale puro.

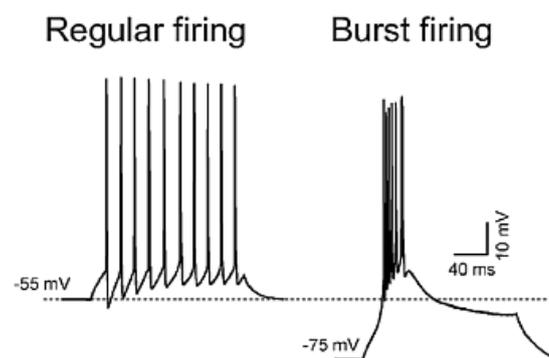


Figure 1.9 Confronto fra attività spiking e attività bursting

# Capitolo 2

## 2. Tool per Analisi dei Dati

Lo scopo di questa sezione è descrivere gli algoritmi di analisi impiegati per la realizzazione di questo lavoro di tesi, con l'obiettivo finale di analizzare i dati raccolti durante gli esperimenti.

### *1.3.1 Spycode*

L'introduzione di dispositivi per registrazioni multicanale (come i Micro Electrode Arrays, MEA) ha permesso di studiare l'interdipendenza neurale e le proprietà computazionali di gruppi di cellule che interagiscono dinamicamente (Miller & Wilson, 2008) e di monitorare l'attività elettrofisiologica di una popolazione cellulare per un lungo periodo di tempo (Bologna et al., 2010; Chiappalone et al., 2006).

Purtroppo, fino al 2010, all'utente non era data la possibilità di effettuare rapidamente un'analisi multicanale su più di un file registrato alla volta. I software commerciali tendevano ad avere solo possibilità limitate di incorporare nuovi strumenti o modificare quelli esistenti. Alcuni ricercatori hanno iniziato a sviluppare strumenti personalizzati in grado di analizzare dati registrati su più elettrodi, come Mea Tools (Egert et al., 2002), Mea Bench (D. Wagenaar et al., 2005) e BSMART (Cui et al., 2008), ma questi strumenti non fornivano una grande varietà di analisi dei dati e non permettevano di gestire diversi file di dati in parallelo.

I gruppi di ricerca del DIBRIS e dell'IIT, per risolvere questi problemi, hanno sviluppato un nuovo pacchetto software: SPYCODE (Bologna et al., 2010) (Figura 2.1) che fornisce un ambiente di lavoro in grado di eseguire una gestione e un'elaborazione efficiente dei dati, poiché include un ricco gruppo di strumenti di analisi dei segnali.

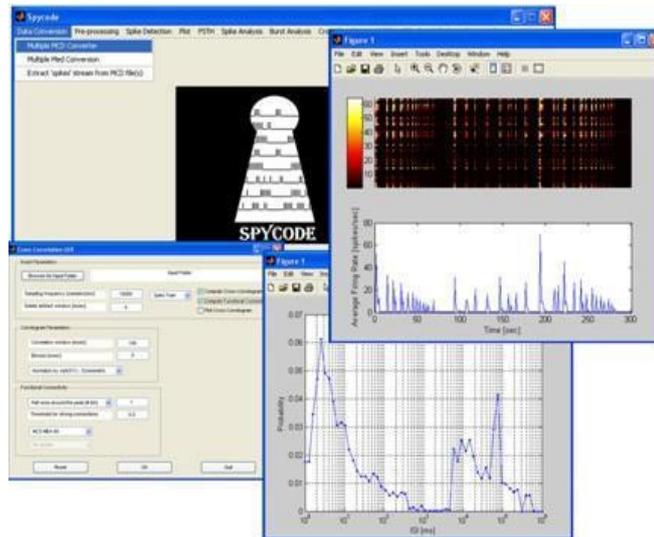


Figure 2.1 Esecuzione di Spycode

Un nuovo tipo di analisi (Figura 2.2, 2.3) è ottenuto attraverso i metodi della teoria dell'informazione, l'estrazione di mappe di connettività, metodi adattivi di rilevamento dei burst su un singolo canale e su gruppi di canali, oltre agli algoritmi classici e più comuni nelle neuroscienze come Spike Detection (rilevamento automatico del potenziale d'azione), Post Stimulus Time Histogram (istogramma che rappresenta la risposta media di una o più cellule in risposta a uno stimolo esterno), Raster Plot (rappresentazione visiva dello spike nel tempo), Mean Firing Rate (la media della frequenza di scarica nel tempo), Inter Burst Interval (intervallo di tempo tra due burst consecutivi), ecc.

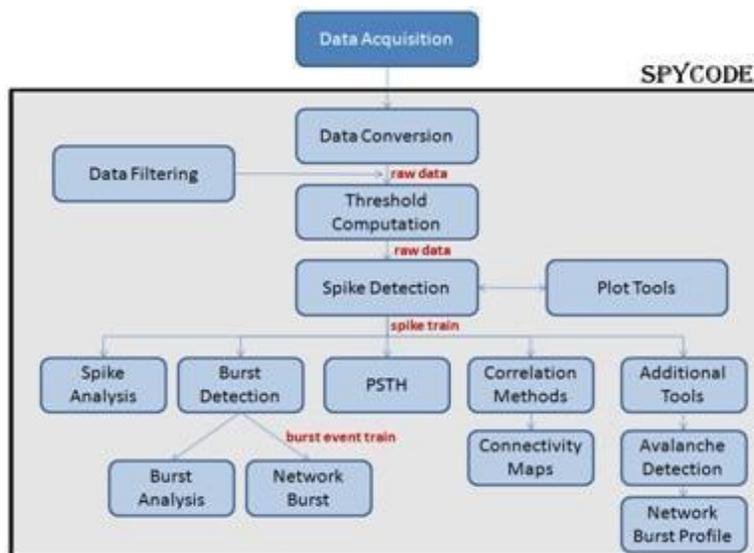


Figure 2.2 Schema della procedura di analisi dei dati implementata in Spycode.

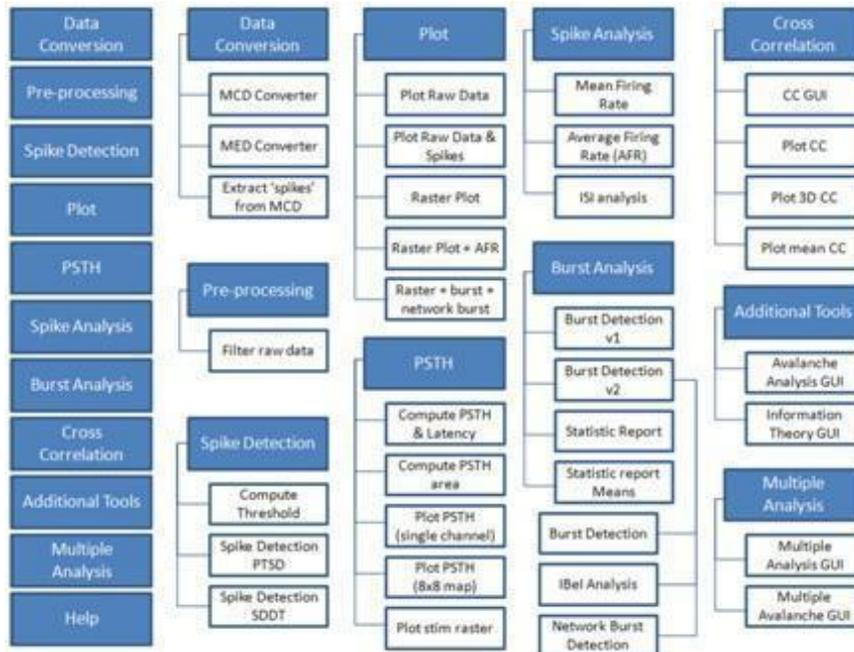


Figure 2.3 La struttura completa del MENU Spycode.

Di seguito, sono presentati i metodi di analisi di questo software che sono stati utilizzati per analizzare i dati degli esperimenti condotti per l'obiettivo di questa tesi.

Si dividono in Spike Analysis, Burst Analysis e Raster Plot:

### 1.3.2 Spike Analysis

#### *Filtraggio dei segnali*

I dati sono stati filtrati mediante un filtro passa alto Butterworth con frequenza di taglio pari a 200 Hz. Questo è necessario perché i dati acquisiti possono contenere rumore a bassa frequenza, come il rumore di fondo, vibrazioni del piano di lavoro o l'interferenza da linee di alimentazione. L'applicazione di un filtro passa alto permette di rimuovere questa componente di bassa frequenza, consentendo di focalizzarsi sugli eventi di interesse, come gli spike.

#### *Spike Detection*

La tempistica degli spike è la prima informazione da estrarre dai dati grezzi. Gli spike sono brevi impulsi di tensione con una durata di circa 1-2 ms. Poiché i rapporti segnale/rumore tipici

sono molto più grandi di uno, il metodo più utilizzato per identificare gli spike è un algoritmo basato sulla soglia (Kamioka et al., 1996).

Il singolo treno di spike è un processo temporale (Spike Train, ST):

$$ST(t) = \sum_{S=1}^N \delta(t - t_s)$$

L'equazione riporta la definizione formale di treno di spike, dove  $t_s$  è la tempistica di uno spike,  $N$  è il numero di spike riconosciuti e  $\delta(t)$  è la funzione delta di Kronecker.

È importante prendere in considerazione la stazionarietà, che svolge un ruolo centrale nei segnali neurali, questa è assente negli esperimenti eseguiti attraverso MEA non impiantabili, sia quando si registra l'attività spontanea, sia quando si applica un protocollo di stimolazione.

Per identificare un picco, è necessario trovare, utilizzando il comando Calcolo delle soglie (Figura 2.4), le soglie per la prima fase di registrazione di ogni esperimento.

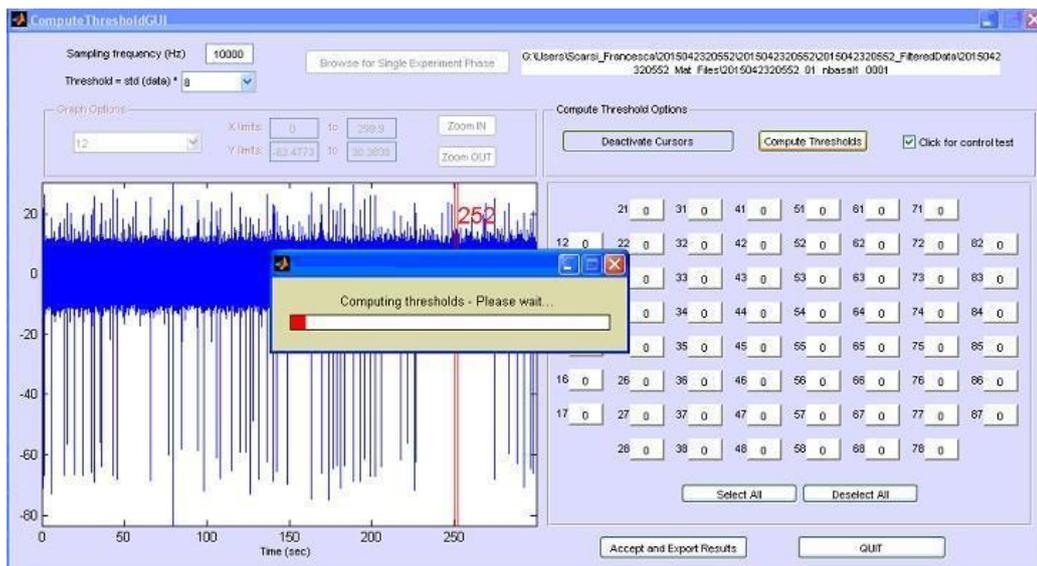


Figure 2.4 Interfaccia di calcolo delle soglie

Una volta individuate le soglie, ai segnali neurali viene applicato un algoritmo di rilevamento degli spike, chiamato PSTD (Precise Timing Spike Detection) (Maccione et al., 2009). Esso consente di aumentare la precisione nell'identificazione dello spike.

Questo algoritmo richiede tre parametri: (1) la soglia differenziale, (2) il periodo di durata del picco, (3) il periodo refrattario.

La soglia differenziale, impostata in modo indipendente per ciascun canale, viene calcolata in base alla deviazione standard del segnale di rumore. L'algoritmo calcola i massimi e i minimi del segnale di tensione registrato: quando viene trovato un minimo, cerca il massimo più vicino con una finestra di larghezza pari al periodo di durata del picco e viceversa. Se la differenza tra i massimi e i minimi trovati supera la soglia differenziale, il picco viene identificato e viene registrato l'istante in cui si presenta. Nel momento in cui l'utente decide di impostare il periodo refrattario, tutti gli altri massimi e minimi con questo ritardo temporale non vengono considerati.

### ***Firing Rate e Mean Firing Rate (MFR)***

Una volta identificati gli spike, il modo più semplice e diretto per caratterizzare il livello di attività di una cellula è calcolare il suo Firing Rate (Schneidman et al., 1998), cioè la frequenza di sparo.

Secondo la definizione di Adrian (Wolbarsht, 1964), la frequenza di sparo è il numero di spike in una finestra temporale piuttosto ampia con  $T$  che rappresenta la durata della registrazione e  $N$  il numero di picchi che si verificano al tempo  $t_s$ . Se contiamo i picchi in una piccola finestra di dimensioni  $\Delta t$ , centrata su  $(t_a - t_b)/2$  e dividiamo per l'ampiezza del bin, calcoliamo l'Instantaneous Firing Rate (IFR), cioè la velocità di scarica istantanea.

In relazione ai MEA, è utile calcolare la FR o la IFR dell'intera coltura e vedere come cambia in base alla stimolazione erogata. Queste grandezze si ottengono semplicemente calcolando l'FR e l'IFR di ogni singolo canale e poi facendo la media tra tutti gli elettrodi attivi della MEA, ottenendo il Mean Firing Rate (MFR) e l'Average Firing Rate (AFR) della rete.

L' MFR è un indicatore statistico che rappresenta il numero di spike per unità di tempo. Può essere definito come una stima temporale mediata, calcolando il tasso tra il numero di spike compresi in un intervallo di tempo  $T$  e lo stesso intervallo di tempo  $T$ .

È un parametro importante perché determina l'attività effettiva dei canali della rete e permette di studiare l'evoluzione del comportamento della stessa in risposta a influenze esterne.

### ***Inter Spike Interval (ISI)***

L'intervallo tra gli spike (ISI) rappresenta l'intervallo di tempo tra due spike successivi. La distribuzione ISI è una stima della funzione di densità di probabilità dell'ISI e rappresenta una statistica utile per descrivere i treni di spike.

Matematicamente può essere espresso con la seguente espressione:

$$\text{ISI}(r) = \sum_{S=1}^{N-1} \delta(t_{S+1} - t_S - r)$$

In cui  $N$  è il numero di spike,  $\tau$  è l'ampiezza del bin e  $t_S$  il punto temporale dello spike  $S$ .

La presenza di attività di bursting in vitro porta di solito a istogrammi ISI bimodali, dove i valori ISI intra-burst sono più bassi, mentre quelli inter-burst sono più alti.

### ***1.3.3 Burst Analysis***

#### ***Definizione di burst***

I burst sono uno dei fenomeni elettrofisiologici rilevanti nell'analisi dell'attività neuronale, i burst sono importanti poiché rappresentano una forma di attività sincrona e altamente coerente tra un gruppo di neuroni.

Possiamo definire il burst come una sequenza di pacchetti di spike densi con una durata pari alla somma degli ISI all'interno del burst e separati da un intervallo chiamato IBI (Inter Burst Interval), relativamente lungo rispetto alla durata del burst.

L'individuazione dei burst nell'attività elettrofisiologica può essere utile per diversi scopi, ad esempio, può fornire informazioni sullo sviluppo e sulla funzione delle reti neurali. L'analisi dei burst può aiutare a comprendere come i neuroni si organizzano e comunicano tra loro per formare circuiti funzionali.

Questa analisi può coinvolgere l'identificazione dei pattern temporali degli spike, l'estrazione di parametri come la frequenza, la durata e l'ampiezza dei burst e l'analisi delle relazioni spazio-temporali tra i neuroni coinvolti nei burst.

#### ***Burst Detection***

L'algoritmo (Pasquale et al., 2010) utilizzato per individuare i burst valuta il logISIH (Logarithmic Inter-Spike Interval Histogram) per cercare la soglia migliore (ISI<sub>th</sub>) tra l'attività intra-burst (cioè all'interno dei burst) e inter-burst (cioè tra i burst e/o fuori dai burst).

Se l'ISI<sub>th</sub> è inferiore a 100 ms, l'algoritmo utilizza il valore di ISI<sub>th</sub> per determinare l'ISI massimo consentito all'interno di un burst.

Al contrario, se ISI<sub>th</sub> è superiore a 100 ms, l'algoritmo utilizza due soglie diverse: la prima (100 ms) viene utilizzata per rilevare i burst core, mentre la seconda (ISI<sub>th</sub>) viene utilizzata per estendere i burst core ai confini per includere tutti i picchi il cui ISI è inferiore a ISI<sub>th</sub>.

### ***Mean Burst Rate (MBR)***

Il Mean Burst Rate fornisce informazioni sul numero medio di burst generati dai neuroni durante un determinato intervallo di tempo.

Per calcolare il Mean Burst Rate, si conta il numero totale di burst registrati durante l'intervallo di tempo considerato, nel nostro caso un minuto, e lo si divide per la durata di tale intervallo. Il Mean Burst Rate può essere utile per valutare l'attività generale delle reti neurali in coltura. Un tasso medio di burst elevato può indicare una maggiore attività sincrona e una comunicazione più intensa tra i neuroni. D'altra parte, un tasso medio di burst più basso può suggerire una minore attività sincrona e una comunicazione meno coerente tra i neuroni.

Il Mean Burst Rate può variare in base a diversi fattori, come la maturità delle colture di neuroni, la densità dei neuroni sulla superficie dell'array e le condizioni sperimentali. Ad esempio, colture di neuroni più mature tendono ad avere un Mean Burst Rate più elevato rispetto a colture meno mature, poiché le reti neurali si sono sviluppate e stabilizzate le connessioni sinaptiche.

L'analisi del Mean Burst Rate può fornire informazioni preziose per la comprensione della dinamica delle reti neurali in vitro e può essere utilizzata per confrontare diverse condizioni sperimentali o trattamenti. [spike/min]

### ***Mean Burst Duration (MBD)***

La Mean Burst Duration, fornisce informazioni sulla durata media dei burst neuronali, cioè il tempo tra l'inizio e la fine di un burst. Per calcolare la Mean Burst Duration si registra la durata di ogni burst individuale durante un determinato intervallo di tempo e poi si calcola la media di queste durate.

La Mean Burst Duration può essere utile per valutare la dinamica temporale dell'attività neuronale. Una durata media del burst più lunga può indicare un'attività sincrona prolungata e una maggiore persistenza delle connessioni sinaptiche coinvolte. D'altra parte, una durata

media del burst più breve può suggerire una maggiore variabilità temporale nell'attività neuronale e una comunicazione meno stabile tra i neuroni.

La Mean Burst Duration, similmente al Mean Burst Rate, può essere influenzata da diversi fattori, come la maturità delle colture di neuroni, la densità dei neuroni sull'array e le condizioni sperimentali. In generale, colture di neuroni più mature tendono ad avere una Mean Burst Duration più lunga rispetto a colture meno mature, poiché le reti neurali sono più sviluppate e stabili.

L'analisi della Mean Burst Duration può fornire informazioni preziose sulla dinamica temporale delle reti neurali in vitro e può essere utilizzata per confrontare diverse condizioni sperimentali o trattamenti. [sec]

### ***Random Spikes***

La percentuale di random spikes fornisce informazioni sulla presenza di spike neuronali non associati a burst o a pattern di attività coerenti.

Per calcolare la percentuale di random spikes, si analizza l'attività neuronale registrata dagli elettrodi durante un determinato intervallo di tempo e si identificano gli spike che non fanno parte di burst o pattern di attività sincrona. Successivamente, si calcola la percentuale di spike casuali rispetto al totale degli spike registrati.

La percentuale di random spikes può essere utile per valutare la presenza di attività spontanee e non sincrone nella rete neurale. Un valore elevato della percentuale di random spikes indica una maggiore presenza di spike casuali, che potrebbero essere attribuiti a eventi neurali non correlati o a rumore di registrazione. D'altra parte, una percentuale di random spikes più bassa suggerisce una maggiore predominanza di attività neuronale organizzata in burst o pattern di attività coerenti.

L'analisi della percentuale di random spikes può fornire informazioni sulla stabilità e sulla coerenza dell'attività neuronale nelle colture di neuroni. Inoltre, può essere utile per valutare l'effetto di diversi trattamenti o condizioni sperimentali sulla presenza di attività spontanee e casuali. [% spike]

### ***Burstiness Index (BI)***

I burst si presentano in forme diverse, quindi il numero di burst non è sufficiente per descrivere la burstiness di una cultura. È essenziale tenere conto delle dimensioni dei burst e del numero aggregato di picchi.

Il BI (D. A. Wagenaar et al., 2006) è un indice che va da 0 (nessun burst) a 1 (non vi sono spike al di fuori dei burst) definito matematicamente come:

$$BI = \frac{f_{15} - 0,15}{0,85}$$

dove  $f_{15}$  è la frazione del numero totale di picchi rappresentata dal 15% dei bins in cui è stata suddivisa la registrazione lunghi 1 secondo con il conteggio maggiore.

Se la frequenza di sparo è tonica, il parametro  $f_{15}$  sarà vicino a 0,15, altrimenti, se la registrazione presenta un pattern di attività burst  $f_{15}$  sarà molto vicino a 1, dato che la maggior parte dello spike sarà contenuta nel burst.

Bisogna sottolineare che, a differenza dei parametri precedentemente illustrati nella sezione di Burst Analysis, il BI si ricava direttamente dai risultati della Spike Detection e integra le informazioni di tutti i canali in un singolo indice per l'intera coltura.

Pertanto, il BI riflette la porzione degli spike all'interno dei burst e fornisce un'illustrazione più dettagliata della struttura dei burst, dove valori di BI più elevati indicano una rete complessivamente dominata da burst e valori di BI più bassi indicano un'attività di spiking più casuale. [Indice da 0 a 1]

### 1.3.4 Raster Plot

Il Raster Plot è una rappresentazione grafica che permette di avere una visione qualitativa dell'attività della rete neurale. Mostra i treni di spike registrati per ciascun elettrodo in funzione del tempo (Figura 2.5).

Le informazioni fornite da questi grafici sono molto importanti, poiché ci permettono di effettuare una prima valutazione generale qualitativa dei dati sperimentali. Osservando il grafico raster, per ogni fase, si possono identificare i canali rumorosi da eliminare per le analisi successive.

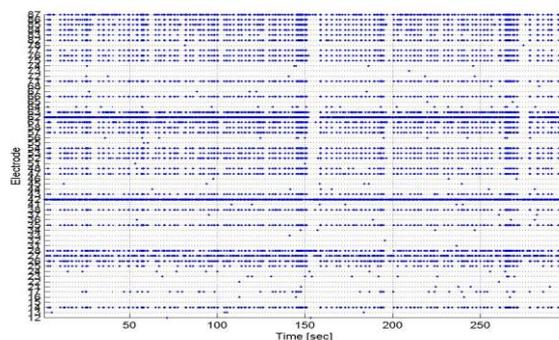


Figure 2.5 Un esempio di raster plot

# Capitolo 3

## 3. Materiali e Metodi Sperimentali

Per questa tesi ho preparato e caratterizzato elettrofisiologicamente e morfologicamente tre diversi tipi di colture di cellule nervose:

- Le colture 2D (Figura 3.1) sono state preparate su MEA 2D: in particolare le cellule sono state piastrate sulla superficie del MEA, precedentemente trattato con un fattore di adesione, e registrate dai suoi elettrodi planari. Il chitosano è stato usato come fattore d'adesione.

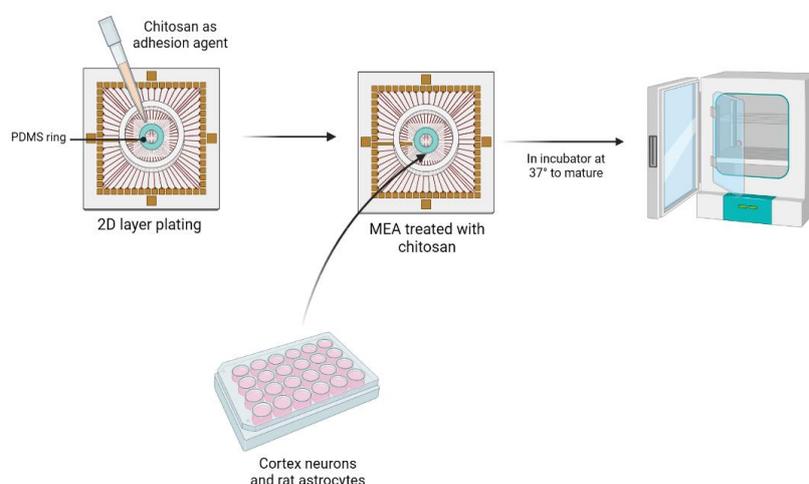


Figure 3.1 Rappresentazione schematizzata della preparazione delle colture 2D

- Le colture 3Dsu2D (Figura 3.2) sono state preparate su MEA 2D, partendo da uno strato 2D di neuroni e successivamente depositando su tale strato bidimensionale uno strato tridimensionale di idrogel contenente cellule neuronali. I neuroni contenuti nello strato tridimensionale di idrogel tuttavia non vengono registrati direttamente dai MEA, dal momento che solo lo strato 2D sul fondo è in contatto con gli elettrodi. L'idrogel di chitosano NeuroGlycoGel viene usato come scaffold.

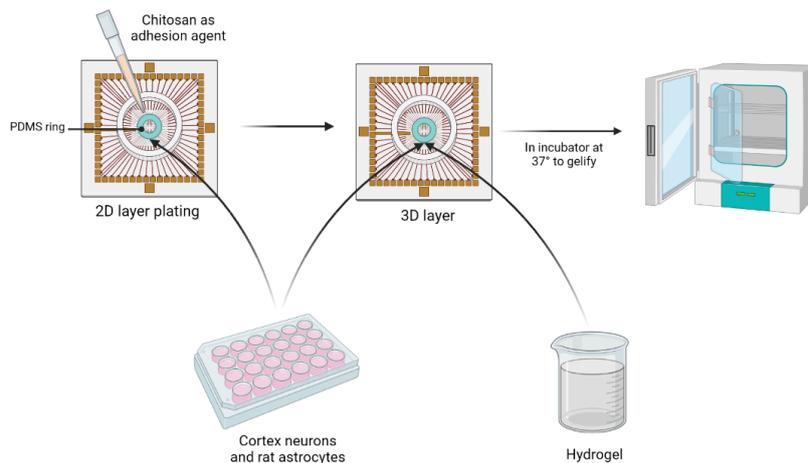


Figure 3.2 Rappresentazione schematizzata della preparazione delle colture 3Dsu2D

- Le colture 3D (Figura 3.3) sono state preparate direttamente su MEA 3D, solo l'attività dello strato di idrogel viene catturata poiché gli elettrodi dei MEA 3D registrano dalla loro punta. Anche in questo caso, l'idrogel di chitosano NeuroGlycoGel viene usato come scaffold.

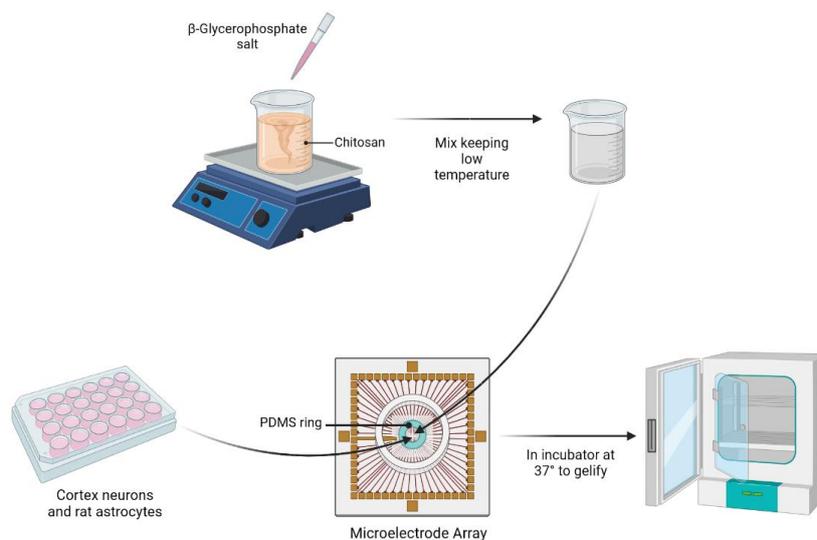


Figure 3.3 Rappresentazione schematizzata della preparazione delle colture 3D

Lo scopo di questa sezione è di esporre più nel dettaglio i materiali e i protocolli utilizzati sia per la preparazione delle colture che per le successive analisi:

## **2.1 Coltura di cellule nervose**

### ***2.1.1 Coltura di astrociti da ratto***

Sono stati utilizzati astrociti corticali di ratto congelati. Gli astrociti sono stati scongelati e piastrati in una flask T-75 con DMEM High Glucose integrato con il 10% di siero bovino fetale e 1% penicillina/streptomicina ed incubati a 37 ° C al 5% di CO<sub>2</sub>.

Il terreno è stato cambiato ogni 3 giorni per 7-10 giorni. Il giorno della piastratura, gli astrociti sono stati mixati con iN (1: 1) in Neurobasal-iN 15

### ***2.1.2 Colture di cellule staminali pluripotenti indotte di derivazione umana (hiPSCs)***

I fibroblasti sono stati prelevati da un donatore sano e le hiPSC sono state generate dalla trasduzione lentivirale, con fattori di riprogrammazione cMYC, SOX2, OCT4 e KLF4.

Successivamente, altri due vettori lentivirali sono stati utilizzati per generare una linea hiPSCs positiva per rtTA / NgN2. Le cellule sono state fornite da Frega et al. e sono state fornite in fiale congelate.

Dopo un rapido scongelamento, le cellule sono state piastrate in sei piastre a pozzetti pre-rivestite con MATRIGEL. La pluripotenza è stata mantenuta in Essential 8 Flex Medium (Thermo Fisher Scientific) integrato con 1% di pen/ strept, 150 ug / ml di G418 e 0,5 ug /ml di puromicina (E8F).

Il terreno è stato cambiato ogni 2 giorni e le cellule sono state suddivise due volte a settimana utilizzando il reagente ReleSR (ReLeSR, Stem Cell Technologies) e integrando il terreno con Revitacell per le 24 ore successive. I campioni sono stati mantenuti in incubatore a 37 ° C 5,5% CO<sub>2</sub>.

### ***2.1.3 Differenziazione hiPSC in neuroni eccitatori***

Grazie alla particolarità della linea hiPSCs positiva rtTa / Ngn2, sono stati generati neuroni corticali eccitatori dello strato 2/3 sovraesprimendo il determinante neuronale Neurogenina 2 (NgN2) al trattamento con doxiciclina.

Quindi, le hiPSC sono state staccate utilizzando un mix enzimatico e piastrate come cellule singole su piastre a 6 pozzetti con terreno E8F con 4 ug / ml di doxiciclina per avviare la differenziazione. Questo passaggio è definito come Day After Differentiation 0 (DAD 0).

Il giorno successivo, il terreno è stato sostituito con DMEM / F12 integrato con supplemento N 2 100x; soluzione di amminoacidi non essenziali MEM 100x , 1% pen / strep, BDNF umano (10ug / ml, ), NT-3 umano (10ug / ml, ) e doxiciclina (4ug / ml). In questa fase le cellule non sono più pluripotenti e possono essere considerate come uno stadio iniziale dei neuroni indotti (iN).

A DAD 3, i neuroni sono stati staccati utilizzando un mix enzimatico e sospesi in mezzo neurobasale) integrato con 1% pen / strept, B-27 50X , glutaMAX 100X , BDNF umano (10ug / ml, NT-3 umano (10ug / ml) e doxycycline (4ug / ml) (ci riferiremo a questo terreno di coltura come NeuroBasal-iN).

Dopo la centrifugazione, il pellet di cellule è stato risospeso in 2 ml di NeuroBasal-iN e le cellule sono state quindi utilizzate per gli esperimenti.

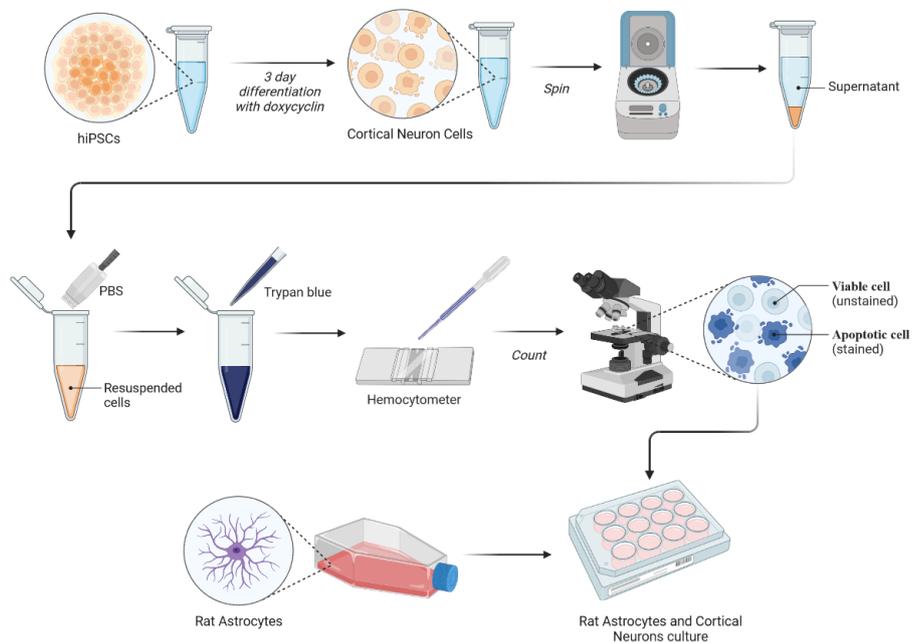


Figure 3.4 Rappresentazione schematizzata della differenziazione e conta delle cellule

### 2.1.4 Preparazione dell' idrogel di chitosano NeuroGlycoGel

NeuroGlycoGel è costituito da due componenti: la soluzione principale a base di chitosano e la soluzione reticolante. Entrambe le componenti vengono fornite sotto forma di polveri.

La soluzione principale si ottiene disciogliendo la polvere in buffer dissolution, lasciandola in agitazione su uno stirrer magnetico overnight.

La soluzione reticolante viene preparata disciogliendo la polvere direttamente nel mezzo di coltura.

Le soluzioni vengono sterilizzate prima di essere utilizzate con le cellule. La soluzione principale viene autoclavata a 120°C per 20 minuti, mentre la soluzione reticolante viene filtrata con un filtro siringa 0.22 µm.

NeuroGlycoGel viene preparato aggiungendo goccia goccia la soluzione reticolante alla componente principale. Le due soluzioni vengono mescolate per 15 minuti mantenendole a una temperatura di circa 4°C per evitare che si inneschi il processo di gelificazione.

### ***2.1.5 Protocollo di preparazione colture neuronali 2D, 3D e 3Dsu2D***

Le colture sono state preparate su MEA delimitando l'area attiva degli elettrodi attraverso l'utilizzo di un anello di PDMS (polidimetilsilossano).

I MEA sono stati lavati utilizzando una soluzione di acqua deionizzata e sapone al 5%. Successivamente sono stati lavati con semplice acqua deionizzata, asciugati utilizzando azoto ed infine sterilizzati in forno per 3 ore ad una temperatura di 120°C.

Come fattore di adesione è stato utilizzata una soluzione di chitosano 1% w/v in acido acetico 0,1M. La soluzione di chitosano è stata sterilizzata in autoclave a 120°C, 1atm, per 20 minuti. La funzionalizzazione dei MEA è stata ottenuta depositando una goccia da 60 µl di soluzione di chitosano sulla superficie di ciascuna matrice. La deposizione delle cellule è avvenuta sfruttando l'anello di PDMS per contenere l'area di piastratura, in modo da raggiungere la concentrazione cellulare desiderata (2500 cellule/mm<sup>2</sup>) in corrispondenza dell'area degli elettrodi. Le matrici sono state incubate overnight in incubatore e la soluzione in eccesso è stata prelevata con una pipetta prima di eseguire due lavaggi con acqua deionizzata ed una normalizzazione con terreno di coltura.

Le colture 3D e 3Dsu2D sono state preparate utilizzando come idrogel termosensibile il NeuroGlycoGel, nel quale sono stati incapsulati i neuroni in co-coltura con gli astrociti. La densità cellulare utilizzata in ogni campione è stata definita a 1 milione per scaffold con 30% di astrociti; 20 µl di questa soluzione gel-cellule sono stati depositati negli anelli di PDMS di ogni MEA. Infine, i MEA sono stati posti in un incubatore a 37° per 45 minuti al fine di innescare il processo di gelificazione, ed è stato aggiunto il terreno di coltura Neurobasal.

## 2.2 Esperimenti di elettrofisiologia per caratterizzazione funzionale

### 2.2.1 Set-up di registrazione

Il set-up sperimentale utilizzato per la registrazione dei dati comprendeva:

- Array di microelettrodi MEA
- Preamplificatore integrato
- Scheda di acquisizione MC Card
- Software MCRack, in grado di visualizzare e registrare online l'andamento del segnale
- Cameretta riscaldata e che contiene 20% O<sub>2</sub>, 75%N<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, in modo da simulare le condizioni in incubatore.
- Termostato

### MEA

Il MEA consiste in una griglia planare di microelettrodi prodotti da Multi Channel System (MCS, Reutlingen, Germania) ed è una tecnologia compatta nata alla fine degli anni '70 per esperimenti in vitro con cellule cerebrali e muscolari. È biocompatibile, resistente e ogni elettrodo ha un'impedenza ragionevolmente bassa (meno di 500 k  $\Omega$  a 1Hz) per consentire la rilevazione di piccoli segnali extracellulari (da 10 a 100  $\mu$ V).

La bassa impedenza consente inoltre di far passare una corrente di stimolazione sufficiente senza superare la tensione di ripartizione elettrochimica dell'acqua e di altri componenti del terreno di coltura (di solito circa 1V) (Potter, 2001). La superficie del MEA e le derivazioni degli elettrodi sono rivestite con un isolante biocompatibile (di solito poliammide o nitruro/ossido di silicio) che impedisce il cortocircuito elettrico con il terreno di coltura e consente l'adesione delle cellule dopo il rivestimento con il substrato di coltura cellulare tradizionale.

Esistono diversi tipi di MEA che si differenziano per il diametro e la distanza tra gli elettrodi. Il più utilizzato è il MEA 60: è composto da 60 elettrodi planari di forma circolare realizzati in nitruro di titanio (TiN) a bassa impedenza. I contatti elettrici sono realizzati in titanio e le parti isolanti in nitruro di silicio. I 60 elettrodi sono disposti secondo diversi layout.

Per questo lavoro sono stati utilizzati due tipi di MEA:

- I MEA 2D (Figura 3.5) sono i più comuni e sono stati utilizzati per misurare l'attività delle colture 2D e 3Dsu2D; sono composti da una matrice quadrata di (8x8) elettrodi in TiN (nitruro di titanio), per un totale di 60 elettrodi. Uno di questi elettrodi è collegato a massa e funge da elettrodo di terra (il numero 15), portando dunque il numero di elettrodi misurabili a 59. Come isolante viene utilizzato il nitruro di silicio (SiN). Questi 60 elettrodi presentano un diametro di 30  $\mu\text{m}$  e distano tra loro 200  $\mu\text{m}$  ed essendo piatti misurano solo l'attività dello strato superficiale che posa su di essi. Il grande numero di elettrodi è necessario per osservare il comportamento di più neuroni contemporaneamente, cosa che diventa rilevante soprattutto per colture mature.

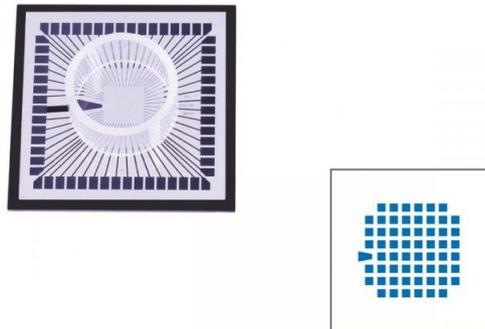


Figure 3.5 Matrice MEA 2D 8x8, 60 canali

- I MEA 3D (Figura 3.6) sono di nuova produzione e sono stati utilizzati per misurare l'attività delle colture 3D, si differenziano dai MEA 2D per la forma dei loro elettrodi che essendo aghiformi penetrano nell'idrogel e permettono di misurare l'attività di uno strato interno della coltura, tuttavia questi elettrodi misurano solo dalla loro punta quindi non sono in grado di misurare strati a differenti profondità di quella a cui penetra la punta dell'elettrodo. Nel nostro caso sono stati utilizzati MEA con 60 elettrodi da 100 micron di profondità.

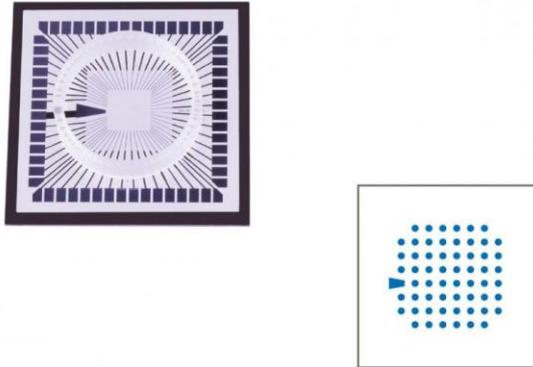


Figure 3.6 Matrice MEA 3D 8x8, 60 canali

Uno dei vantaggi dei MEA rispetto ad altri metodi di indagine elettrofisiologica risiede nel fatto che sono in grado di mantenere in vita i neuroni per diverse settimane: per consentire ciò, la coltura è immersa in un terreno con tutti i nutrienti necessari grazie a un anello di vetro, alto 6 mm, posizionato intorno all'array.

La coltura è solitamente coperta da un coperchio ermetico in polidimetilsilossano (PDMS) (Figura 3.7). Il PDMS è un polimero biocompatibile e trasparente che può essere modellato per ottenere forme specifiche e possiede proprietà utili, come la permeabilità ai gas (ad esempio la CO<sub>2</sub>, necessaria per mantenere condizioni di pH stabili) e l'impermeabilità al vapore acqueo, riducendo così l'evaporazione e quindi le variazioni di osmolarità del terreno. Inoltre, fornisce una barriera fisica che impedisce in larga misura l'ingresso di agenti patogeni presenti nell'aria.



Figure 3.7 Coperchi di polidimetilsilossano PDMS.

## **Amplificatore**

Lo stadio di amplificazione (Figura 3.8) sviluppato appositamente per i MEA ha permesso di risolvere alcuni problemi fondamentali, quali la riduzione dei cavi necessari a connettere simultaneamente 60 elettrodi e l'eliminazione di interferenze tra i diversi canali dovute a fenomeni di cross-talk.

L'amplificatore utilizzato nell'ambito di questa tesi è un dispositivo integrato contenente uno stadio di preamplificazione e uno stadio di filtraggio per ciascuno dei 60 canali.

La matrice MEA viene posizionata al centro del dispositivo e interfacciata per mezzo di file di connettori ad ago. Il design risulta compatto e grazie alla tecnologia SMD (surface-mounted) dei pre-amplificatori e pre-filtri, l'intero hardware, il circuito completo e l'amplificatore, sono stati realizzati in un singolo alloggiamento assicurando un ottimo rapporto segnale/rumore durante la fase di registrazione.

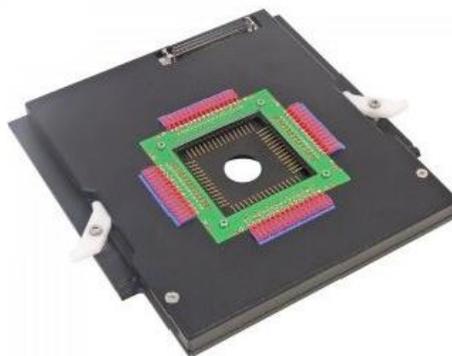


Figure 3.8 Amplificatore per MEA

## **MC Card**

Per l'acquisizione e registrazione dei segnali provenienti dalla matrice di micro-elettrodi sono stati impiegati una scheda di acquisizione e un software per la visualizzazione real time dei segnali elettrofisiologici (MCRack). La scheda di acquisizione MC Card (Figura 3.9) è dotata di un convertitore A/D che permette di registrare segnali provenienti da 128 canali, campionati ad una frequenza massima di 50 kHz e risoluzione a 12 bit. La velocità di campionamento ed

il guadagno sono selezionabili dal software, potendo variare all'interno di una gamma di valori compresi tra  $\pm 4V$  e  $\pm 400mV$ .



Figure 3.9 MC Card

## MCRack

MC Rack (Figura 3.10) è un software di acquisizione fornito dalla Multichannel Systems per la registrazione di dati provenienti da schede multicanale. Sul monitor vengono visualizzate le finestre temporali del segnale di tutti i 60 elettrodi, consentendo di monitorare online, anche in fase di registrazione, l'andamento dei segnali.

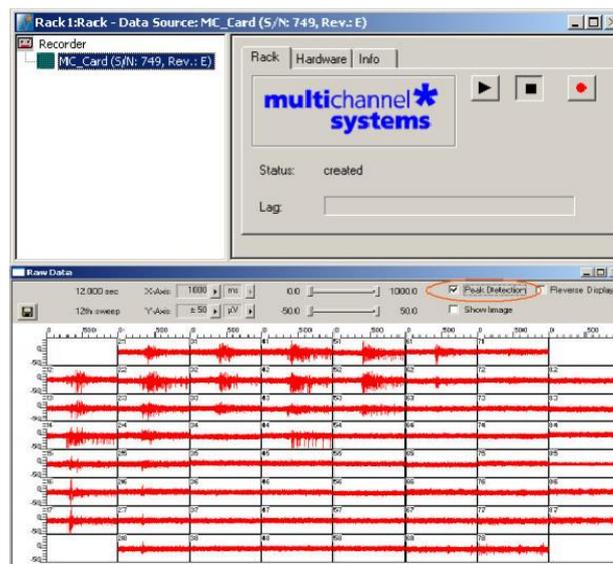


Figure 3.10 MCRack

## Controllo Atmosferico

Per limitare al minimo lo stress cellulare dovuto all'uscita dall'incubatore, si è cercato di replicarne il microambiente, andando a controllare parametri come temperatura e concentrazione di CO<sub>2</sub> nell'area di registrazione dei MEA.

Per il controllo atmosferico è stata progettata una camera che, attraverso dei tubicini, riceve un flusso costante di una miscela di CO<sub>2</sub> al 5%, O<sub>2</sub> al 20% e N<sub>2</sub> 75%, mantenendo le cellule nelle condizioni ottimali (pH  $\approx$  7.4 e osmolarità  $\approx$  230 mOsm ).

## Termostato

Tutte le rilevazioni MEA sono state effettuate ad una temperatura di 37.0°C ottimale per la crescita delle cellule in coltura e per una buona risposta agli stimoli. Collegato alla base di amplificazione, un piccolo termostato (Figura 3.11) ha permesso di mantenere la temperatura desiderata sulla piastra di appoggio dei MEA.



Figure 3.11 Termostato

### 2.2.3 Protocollo di registrazione

Le sessioni di registrazione si sono svolte:

- Per le colture 2D a: 21DIV, 26-28 DIV, 32-34 DIV, 37-41 DIV (Figura 3.12).

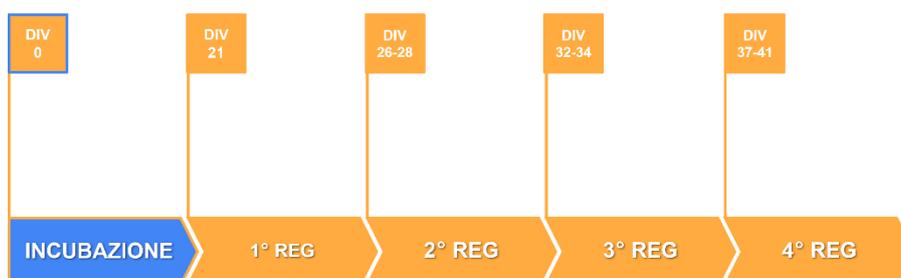


Figure 3.12 Sessioni di registrazione per colture 2D

- Per le colture 3Dsu2D a: 31DIV, 39DIV, 46DIV, 53DIV, 60DIV, 67DIV, 70DIV, 73DIV (Figura 3.13).

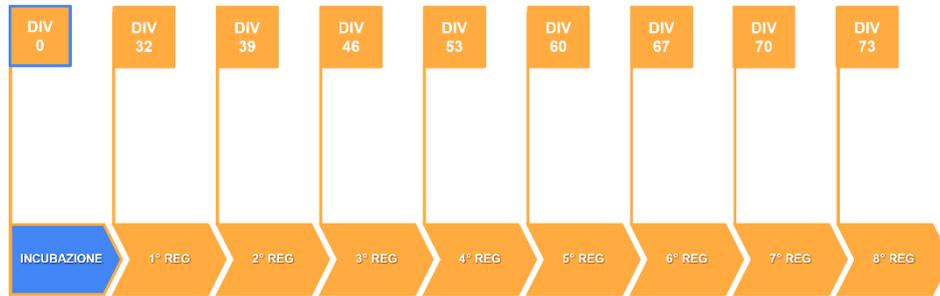


Figure 3.13 Sessioni di registrazione per colture 3Dsu2D

- Per le colture 3D a: 27DIV, 32DIV, 39DIV, 46DIV, 53DIV, 60DIV, 67DIV, 74DIV, 81DIV, 88DIV, 95DIV, 99DIV, 102DIV, 109DIV (Figura 3.14).

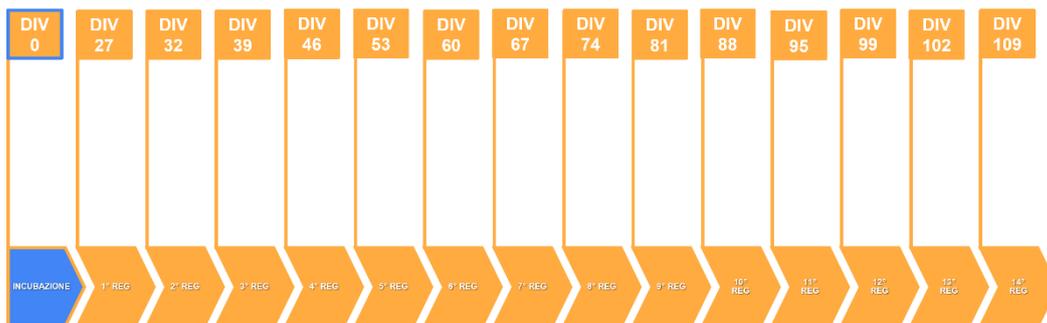


Figure 3.14 Sessioni di registrazione per colture 3D

In ciascuna sessione di registrazione sono stati utilizzati gli strumenti citati nei capitoli precedenti e solo successivamente all'ottenimento dei dati si è proceduto ad un cambio parziale di terreno di coltura, rimuovendo con una pipetta 0,6 ml ed inserendo 0,8 ml freschi.

Il modus operandi seguito per tutte le acquisizioni è il seguente:

- 5 minuti di adattamento (37°C, [CO<sub>2</sub>] al 5%, umidità [85-95]%)
- 10 minuti di registrazione dell'attività elettrofisiologica (37°C, [CO<sub>2</sub>] al 5%, umidità [85-95]%)

I dati raccolti sono stati successivamente analizzati impiegando gli algoritmi descritti nello stato dell'arte.

## 2.2.4 Database e organizzazione dei dati

I dati raccolti durante gli esperimenti sono stati organizzati in un database Excel (Figura 3.15) per consentire una rapida visualizzazione degli aspetti che hanno caratterizzato ciascuno di essi.

I principali campi di interesse sono:

- Nome del file dell'esperimento: ogni esperimento è dotato di un nome, si tratta di una stringa che contiene informazioni sull'esperimento che è stato eseguito e l'ID del MEA utilizzato;
- DIV: identifica il numero di giorni in vitro;
- Data: è la data in cui è stato eseguito l'esperimento;
- ID MEA: il codice identificativo del MEA utilizzato,
- MEA type: identifica il tipo di MEA utilizzato;
- Elettrodi esclusi: gli elettrodi esclusi dalla registrazione perché rumorosi;
- Qualità della coltura: è una valutazione dell'attività della coltura. L'apprezzamento riguarda le prestazioni della rete osservate durante l'esecuzione dell'esperimento.

REC	TIME	DATA	FILENAME	DIV	MATRICE	EL ESCLUSI	COMMENTI
1	10 min	04/05/22	39702_DIV27_basal_10min.mcd	27	2d	71 53	attività su 371, 35, 25, 38, 14, 24
2	10 min	09/05/22	39702_DIV232_basal_10min.mcd	32	2d		13, 24, 35, 25, 14, 24, 34, 371 burstano insieme   lato destro silente
3	10 min	11/05/22	39702_DIV34_basal_10min.mcd	34	2d		lato destro silente / 211, 13, 24, 37, 35, 13, 34, 25, burstano insieme
4	10 min	16/05/22	39702_DIV39_basal_10min.mcd	39	2d		lato destro silente / burst su area in alto a sinistra intorno a 23
5	10 min	04/05/22	34366_DIV27_basal_10min.mcd	27	2d	43 71	22, 23, 26, 27, 57, 56, 84, 82, 12, 76, 78, 72, 82, 84 ALL, bursting
6	10 min	09/05/22	34366_DIV32_basal_10min.mcd	32	2d		ALL bursting 30 sec, 33, 47, 53, 72, 82, 22, 23, 27
7	10 min	11/05/22	34366_DIV34_basal_10min.mcd	34	2d		ALL bursting 25 sec, 75, 53, 22, 56, 47, 22, 72, 23, 26, 17, 25, 72, 82, 27,
8	10 min	16/05/22	34366_DIV39_basal_10min.mcd	39	2d		ALL bursting long time inbetween 1 min, 26, 35, 23, 57, 74, 85, 24, 25, 53, 72, VERY long burst at the end of rec
9	10 min	04/05/22	25422_DIV27_basal_10min.mcd	27	2d		27, 43, 23, 74
10	10 min	09/05/22	25422_DIV32_basal_10min.mcd	32	2d		27, 23, 22, 65, weak burst
11	10 min	11/05/22	25422_DIV34_basal_10min.mcd	34	2d		23, weak burst, 25, 82, 66, 67, 87, 45, 31, 41, 23, 61, 23, 25, 45,
12	10 min	16/05/22	25422_DIV39_basal_10min.mcd	39	2d		27, 17, 23, 43, 66, 71 weak burst
13	10 min	04/05/22	34368_DIV27_basal_10min.mcd	27	2d		581, 78, 48, 33, 21, 32, 63, 34, 24, 43, 57, 56, 21
14	10 min	09/05/22	34368_DIV32_basal_10min.mcd	32	2d		33, 78, 47, 68, 33, 24, 56, 71 all burst bassi
15	10 min	11/05/22	34368_DIV34_basal_10min.mcd	34	2d		14 maybe a bit noisy at first, ALL bursting, 24, 45, 44, 47, 56,
16	10 min	16/05/22	34368_DIV39_basal_10min.mcd	39	2d		ALL bursting 10 sec, 57, 24, 44, 33, 42, 66
17	10 min	04/05/22	34344_DIV27_basal_10min.mcd	27	2d		ALL bursting frequently 7 sec, 25 quieter
18	10 min	09/05/22	34344_DIV32_basal_10min.mcd	32	2d		ALL bursting frequently 7 sec, 25 quieter, 66 is huge when bursting
19	10 min	11/05/22	34344_DIV34_basal_10min.mcd	34	2d		57 maybe bit noisy at first, ALL bursting frequently 15 sec, 66 is huge when burst, 25 quieter, 58, 75, 85, 22, 12, 21, 66, 58, 87
20	10 min	16/05/22	34344_DIV39_basal_10min.mcd	39	2d		WOW ALL burst ogni 4 sec, 66 is huge when bursting, 25 quieter/ 43, 61, 85, 66, 58
21	10 min	09/05/22	34336_DIV32_basal_10min.mcd	32	2d	43 da escludere	43 rumoroso, anello rotto, attività in basso sinistra
22	0 min	11/05/22	34336_DIV32_basal_10min.mcd	34	2d		anello rotto/ NO REC
23	5	27/05/22	39487_DIV21_basal_5min.mcd	21	2d		63, 62, 66
24	10 min	01/06/22	39487_DIV26_basal_10min.mcd	26	2d		soprattutto meta superiore small burst, 61, 43, 22, 84, 53, 43
25	10 min	08/06/22	39487_DIV33_basal_10min.mcd	33			all soprattutto meta superiore burst, 54 silent/ 45
26	20 min	15/06/22	39487_	41			fatte da davide
27	5	27/05/22	24800_DIV21_basal_5min.mcd	21	2d		sotto soglia, forse rumore vibr
28	10 min	01/06/22	24800_DIV26_basal_10min.mcd	26	2d		sotto soglia,

Figure 3.15 Screenshot del Database

## 2.3 Esperimenti di Imaging per caratterizzazione morfologica

### 2.3.1 Microscopio in fluorescenza

Le immagini in fluorescenza sono state acquisite utilizzando un microscopio Olympus BX-51, con camera CCD a raffreddamento Hamamatsu Orca ER II (Figura 3.16) per mezzo del software ImageJ ProPlus (Media Cybernetic).



Figure 3.16 Microscopio Olympus BX-51, con camera CCD a raffreddamento Hamamatsu Orca ER II

### 2.3.2 Tecnica di immunofluorescenza

Per valutare la morfologia della coltura a fine esperimento è stata sfruttata la tecnica di immunofluorescenza (Figura 3.17). Questa tecnica viene impiegata per evidenziare alcune componenti cellulari consentendo in questo modo di poterle visualizzare e valutare al microscopio.

Più precisamente si ricerca, nelle componenti che si vogliono evidenziare, la presenza di particolari antigeni mediante impiego dei rispettivi anticorpi, i quali, resi fluorescenti da un fluoroforo, rispondono all'assorbimento di fotoni esibendo fluorescenza a diverse lunghezze d'onda. La differenza tra i diversi fluorofori che si possono utilizzare è data dal diverso spettro di assorbimento e di emissione.

Le colture sono state lavate con PBS preriscaldato a 37°C e dunque fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% per 15 minuti a temperatura ambiente. Rimossa la PFA ed eseguiti due lavaggi in PBS, è stato applicato Triton-X in concentrazione 0,3% diluito in PBS per 10 minuti, con lo scopo di aumentare la permeabilizzazione cellulare.

Il legame non specifico degli anticorpi è stato bloccato attraverso un'incubazione di 45 minuti in una soluzione tampone "Blocking Buffer" costituita da PBS, 0,3% di BSA (albumina di siero bovino) e 0,5% di FBS (siero bovino fetale).

Le colture sono state marcate con anticorpi primari: Tubulina  $\beta$ III (1: 500, proteina associata ai microtubuli dendritici), GFAP(1:500, associata alla proteina fibrillare acida della glia), diluiti in Blocking Buffer per 2 ore a temperatura ambiente.

Successivamente sono state lavate tre volte con PBS ed infine esposte all'anticorpo secondario: Alexa Fluor 488, Goat anti rabbit, diluito 1:700, Goat anti mouse diluito 1:1000. Infine, i campioni sono stati esposti al Dapi 1:10000 (marcatore dei nuclei che si lega alle regioni ricche in A-T del DNA) per 10 min.

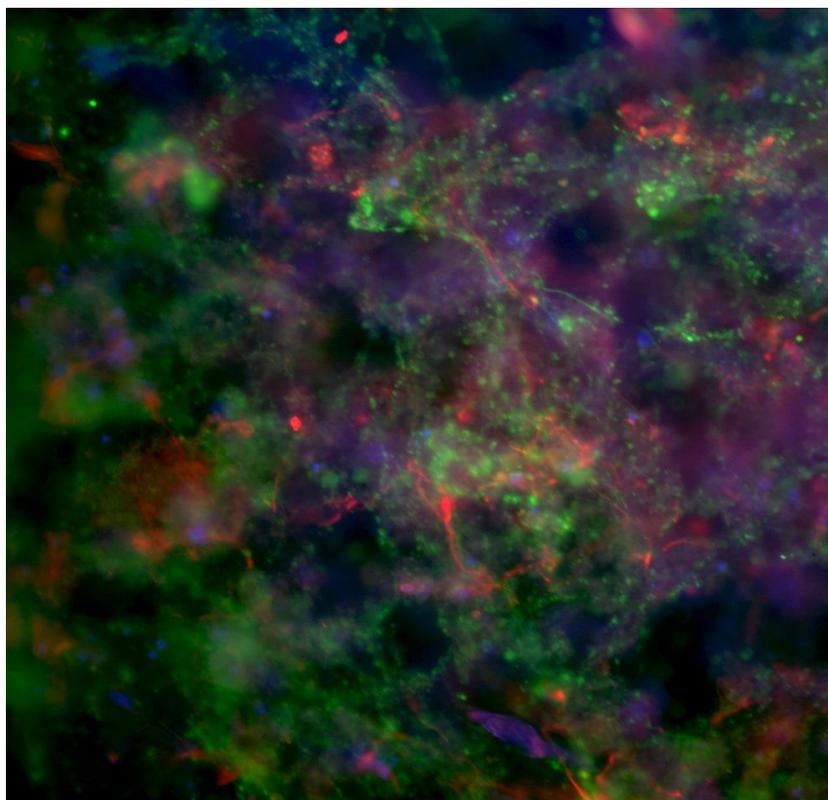


Figure 3.17 Esempio di immunofluorescenza su coltura in idrogel 3D.

Immagine acquisita con un ingrandimento 10x e coltura marcata a 103DIV con Tub $\beta$ III (verde), GFAP(rosso) e Dapi (blu).

# Capitolo 4

## 4. Risultati

- Sono stati registrati 20 campioni 2D la cui attività spontanea è stata catturata fino al DIV 41, di questi, 9 hanno mostrato attività esclusivamente sotto-soglia e sono stati esclusi dai risultati.
- Sono stati registrati 2 campioni 3D la cui attività spontanea è stata catturata fino al DIV 109, di questi, 1 ha mostrato attività esclusivamente sotto-soglia ed è stato escluso dai risultati.
- Sono stati registrati 11 campioni 3Dsu2D la cui attività spontanea è stata catturata fino al DIV 73, di questi, 8 hanno mostrato attività esclusivamente sotto-soglia e sono stati esclusi dai risultati.

### 4.1 Analisi Qualitativa

Una volta registrati i dati elettrofisiologici, si è passato alla parte di manipolazione degli stessi. Le registrazioni sono state filtrate (Butterworth Passa Alto 200Hz) ed è stato applicato un algoritmo di spike detection (PTSD). I risultati prodotti da questo algoritmo evidenziano gli eventi di spike rilevati all'interno del segnale registrato. Per verificare se l'algoritmo di PTSD fosse andato a buon fine, ma soprattutto per ottenere quello che è un primo dato confrontabile sull'andamento dell'attività elettrofisiologica delle matrici, sono stati prodotti dei grafici rasterplot.

I grafici riportati mostrano l'attività elettrofisiologica registrata in funzione del tempo di tutti i 60 elettrodi appartenenti ad una matrice. Sono mostrati i dati ottenuti nei primi 2 dei 10 minuti di registrazione in quanto comunque rappresentativi dell'andamento delle matrici.

### 4.1.1 Campioni 2D

Essendo I campioni 2D molto numerosi (N=11) vengono mostrati soltanto i raster plot di un campione rappresentativo del profilo evolutivo generale.

Dai grafici Raster Plot (Figura 4.1) si può immediatamente notare un'evoluzione dell'attività con il passare del tempo per la coltura 2D rappresentativa.

Questa evoluzione si declina in primo luogo in un aumento complessivo della frequenza di spiking per poi esplicitarsi in un progressivo passaggio dell'intera rete a un'attività prevalentemente bursting, sincronizzata su tutti i canali.

La quasi totalità dei canali inoltre risulta attiva.

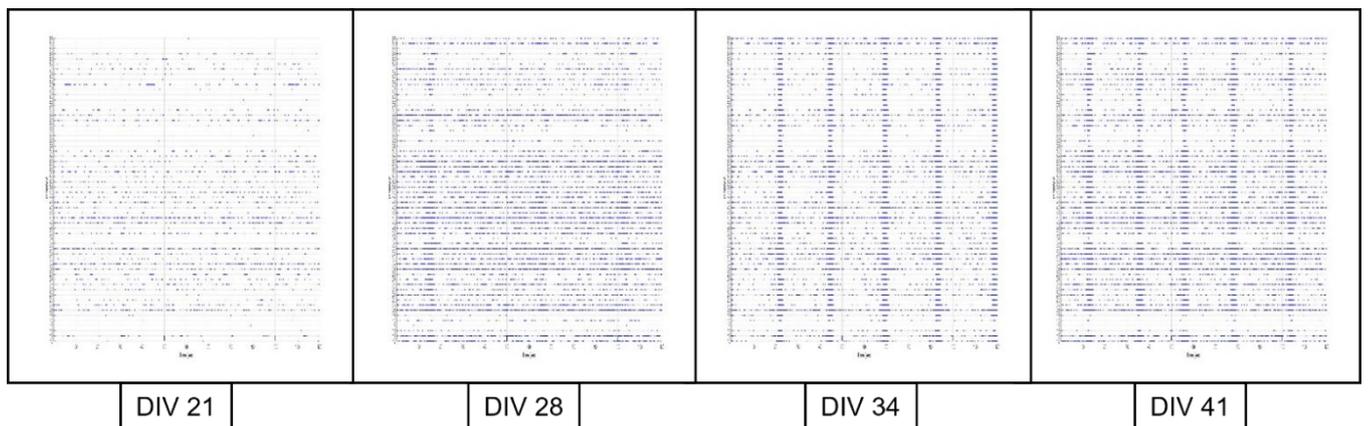


Figure 4.1 Raster Plot per la coltura 2D rappresentativa rispettivamente a DIV 21,28,34,41

### 4.1.2 Campione 3D

Dato che i campioni 3D sono stati registrati per numerosi giorni, nella maggior parte dei quali non si è vista attività, vengono mostrati solo i raster plot delle registrazioni più salienti, partendo dal DIV in cui si è potuto notare un principio di attività, in modo da trasmettere sinteticamente il profilo evolutivo del campione.

Dai grafici Raster Plot (Figura 4.2) si può immediatamente notare come il campione 3D maturi molto più lentamente del 2D. Questo infatti non mostra attività prima del DIV 46 quando due canali iniziano ad esprimere una leggerissima attività di spiking, questa attività inizialmente aumenta con il passare dei giorni tuttavia la maggior parte dei canali rimane silente o comunque molto meno attiva dei restanti canali, i quali in contrasto mostrano una discreta attività.

Dopo questo primo aumento però l'attività manca di ulteriore evoluzione e rimane sostanzialmente uguale col passare del tempo.

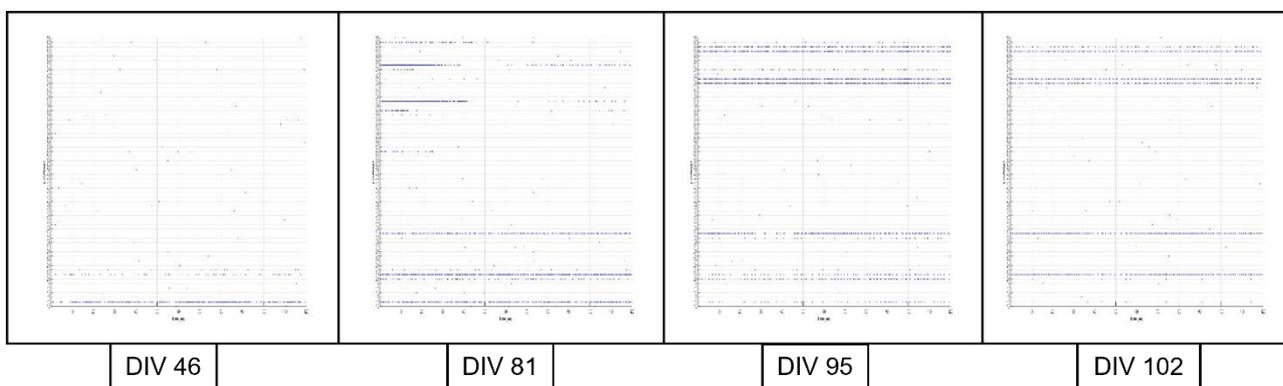


Figure 4.2 Raster Plot per la coltura 3D rappresentativa rispettivamente a DIV 46,81,95,102

### 4.1.3 Campioni 3Dsu2D

Dato che i campioni 3Dsu2D sono stati registrati per numerosi giorni, nella maggior parte dei quali non si è vista attività, vengono mostrati solo i raster plot delle registrazioni più salienti per ognuno dei campioni attivi, in modo da trasmettere sinteticamente il loro profilo evolutivo.

Dai grafici Raster Plot (Figura 4.3, 4.4, 4.5) si può immediatamente vedere come, similmente al caso 3D, i campioni 3Dsu2D maturino molto più lentamente del 2D. Questi infatti non mostrano attività per la maggior parte della loro vita, e quando lo fanno, questa attività si concentra su pochi canali e manca di evoluzione, rimanendo sostanzialmente uguale col passare del tempo, con l'eccezione per una tendenza a passare da un'attività principalmente spiking ad una principalmente bursting.

Inoltre si può notare come, nonostante il profilo evolutivo sia simile fra i 3 campioni, questi si sviluppino su DIV considerevolmente diversi fra un campione e l'altro; ciò, in congiunzione con la bassa quantità di datapoint, non ha permesso di effettuare una media fra campioni come nel caso 2D.

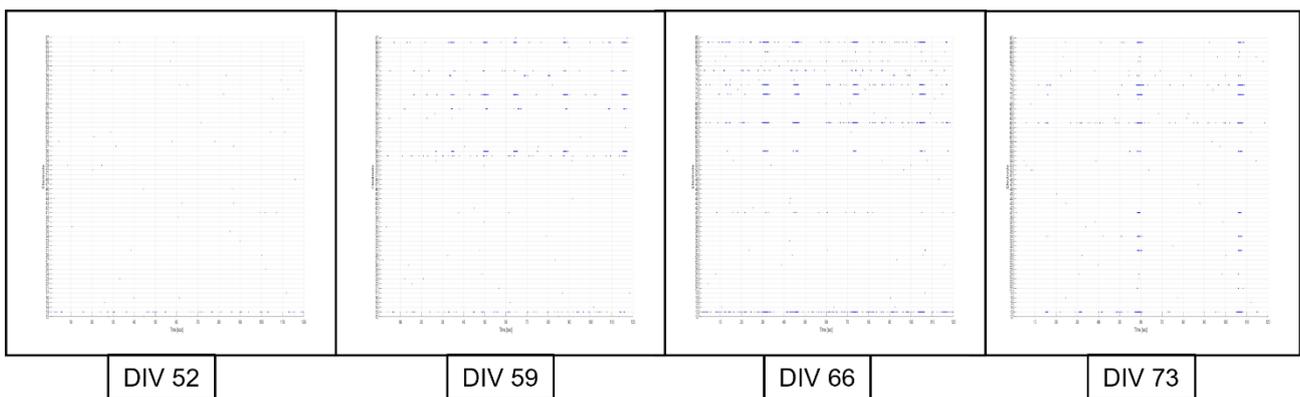


Figure 4.3 Raster Plot per la coltura 3Dsu2D A rispettivamente a DIV 46,53,60,66

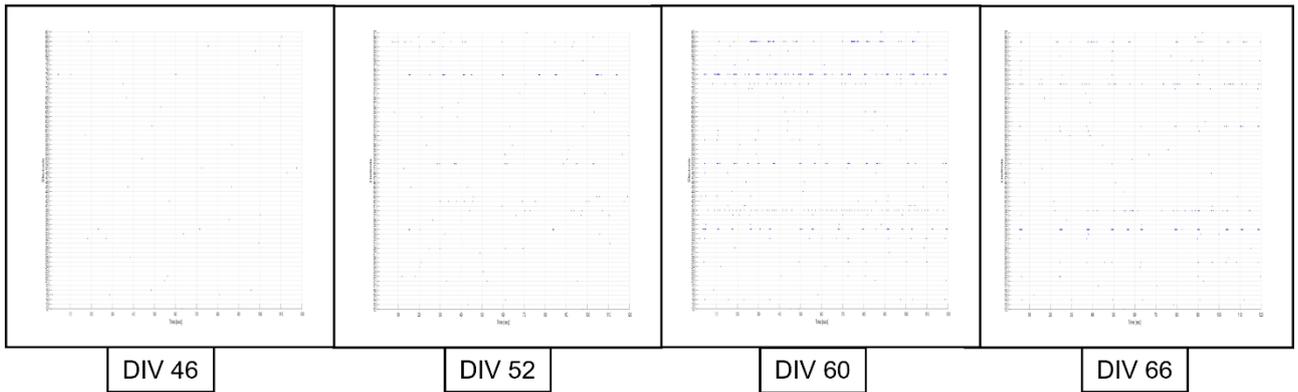


Figure 4.4 Raster Plot per la coltura 3Dsu2D B rispettivamente a DIV 46,52,60,66

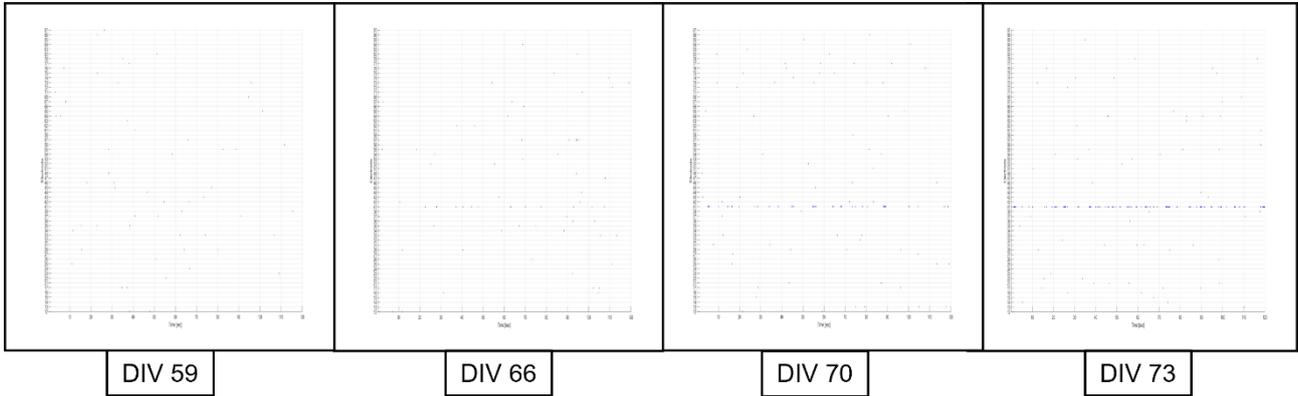


Figure 4.5 Raster Plot per la coltura 3Dsu2D C rispettivamente a DIV 59,66,70,73

## 4.2 Analisi Quantitativa

È stata in seguito effettuata un'analisi quantitativa dei dati, andando a valutare i parametri principali estrapolabili dalla rete che ne descrivono la dinamica:

- **Mean firing rate (spike/sec)**
- **Burstiness Index (0 to 1)**
- **Mean burst rate (burst/min)**
- **Mean burst duration (sec)**
- **Percentuale di random spike (% di spike fuori dai burst)**

Con lo scopo di avere una più significativa comprensione dell'andamento e delle modifiche funzionali dei campioni, le analisi sono state eseguite sul numero dei canali complessivi appartenenti a ciascuna categoria in ogni timepoint di registrazione. I dati elencati sotto riportano dunque le misure della media ottenuta giorno per giorno dai valori di tutti i canali per ciascun gruppo di analisi, nel caso dei modelli 2D sono rappresentate innanzitutto la media dei canali di un singolo campione rappresentativo e successivamente le medie delle medie di tutti i campioni; nel caso dei modelli 3D e 3Dsu2D sono rappresentate solo le medie sui canali di singole matrici rappresentative.

Per il dataset 2D è stata inoltre effettuata un'analisi statistica ANOVA, in particolare nei grafici sono integrati i risultati del test di Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

I grafici sono stati prodotti mediante il software OriginLab, i test statistici sono stati eseguiti attraverso MATLAB e OriginLab e le misure sono state espresse come  $\text{media} \pm \text{errore standard}$ .

### 4.2.1 Campione 2D Rappresentativo

#### Mean Firing Rate

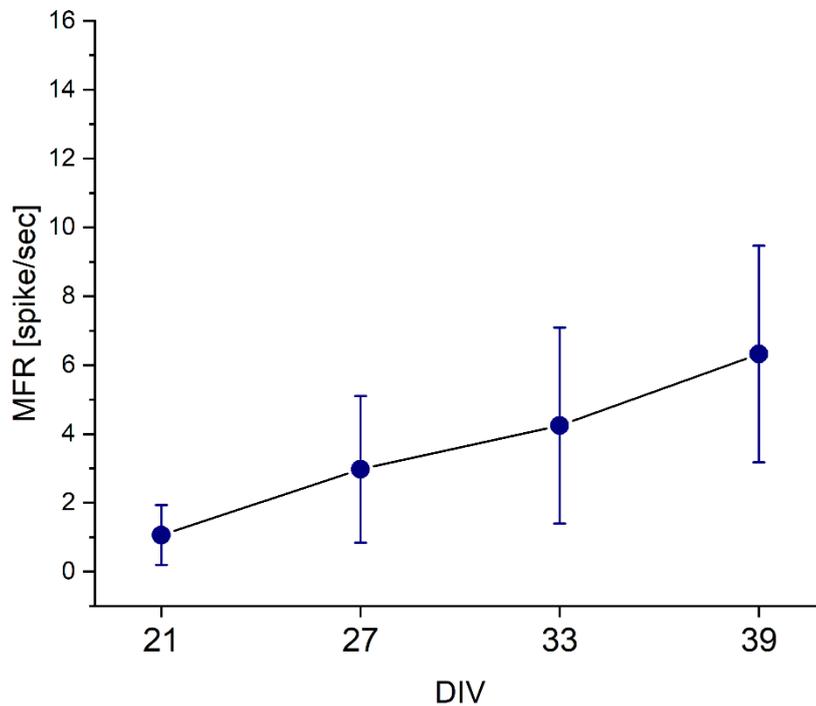


Figure 4.6 Andamento MFR campione 2D rappresentativo

Dal grafico (Figura 4.6) si può vedere una crescita pressoché lineare del MFR che coincide con la maturazione del campione e la sua aumentata attività.

### *Burstiness Index*

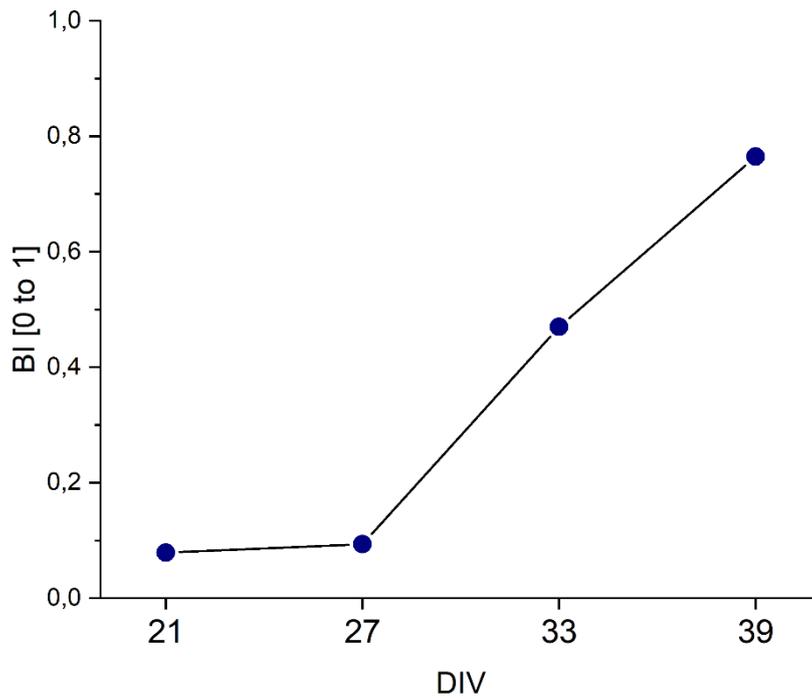


Figure 4.7 Andamento BI matrice 2D rappresentativa

Dal grafico (Figura 4.7) si vede che l'attività di bursting è quasi nulla nelle prime due sessioni di registrazione, per poi aumentare bruscamente nelle ultime due, assumendo infine un comportamento quasi totalmente bursting.

### *Mean Bursting Rate*

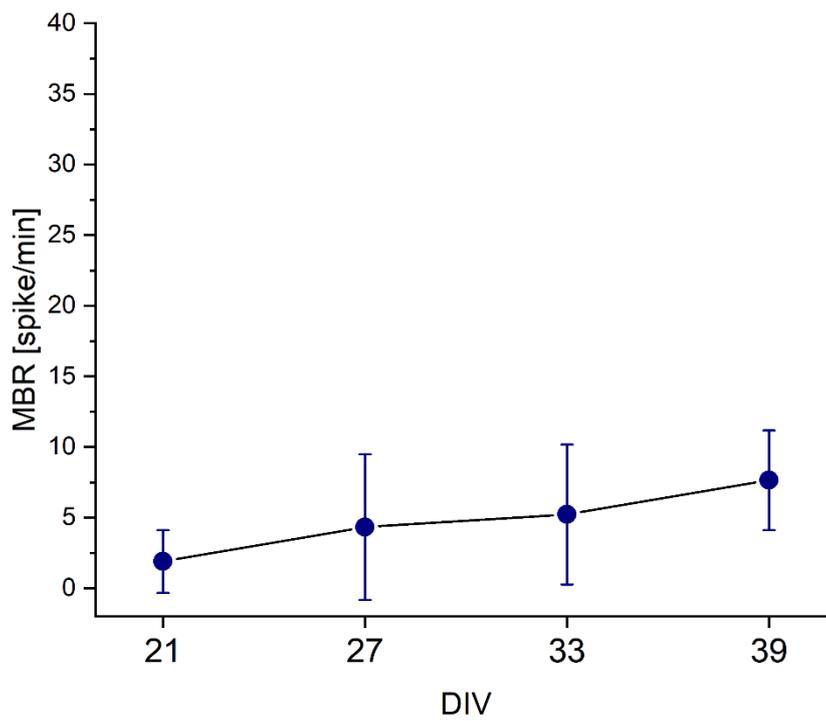


Figure 4.8 Andamento MBR matrice 2D rappresentativa

Dal grafico (Figura 4.8) si può vedere che il MBR aumenta leggermente con il passare dei giorni.

### *Mean Bursting Duration*

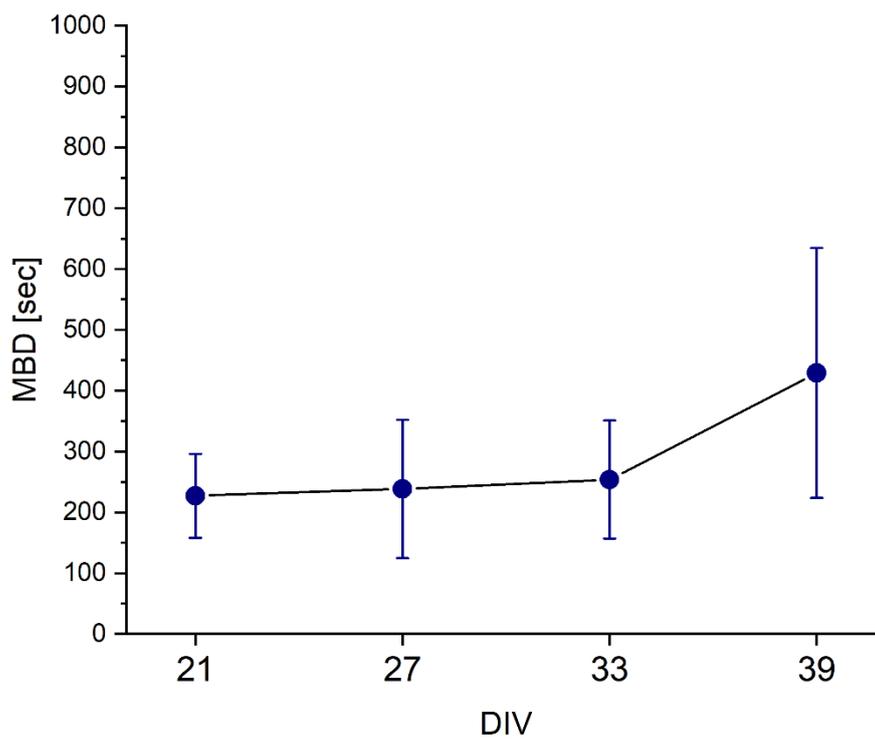


Figure 4.9 Andamento MBD matrice 2D rappresentativa

Dal grafico (Figura 4.9) si può vedere che la MBD è quasi costante per le prime tre sessioni per poi aumentare significativamente nell'ultima.

## Random Spikes

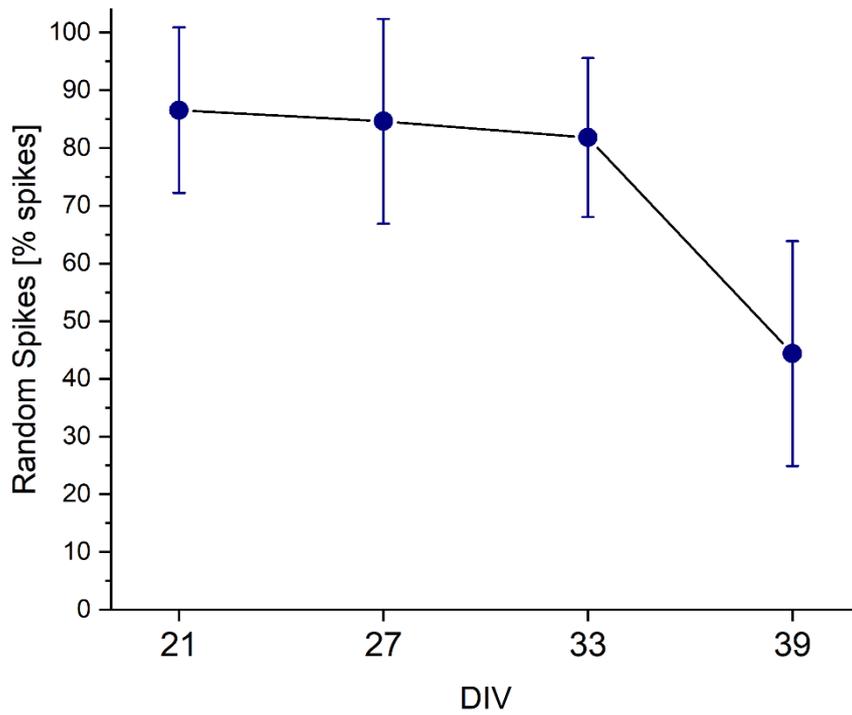


Figure 4.10 Andamento Random Spikes matrice 2D rappresentativa

Dal grafico (Figura 4.10) si può vedere che il numero di random spike al di fuori dei burst è in leggera decrescita per le prime tre sessioni per poi decrescere significativamente nell'ultima, indicando un comportamento prevalentemente bursting.

## *Commenti*

Con il passare del tempo si può notare un:

- Aumento considerevole del firing rate
- Passaggio ad un'attività prevalentemente bursting (Burstiness Index tendente ad 1 e percentuale di Random Spike decrescente)
- Risultati coerenti con la letteratura

## 4.2.2 Analisi del dataset 2D

### Mean Firing Rate

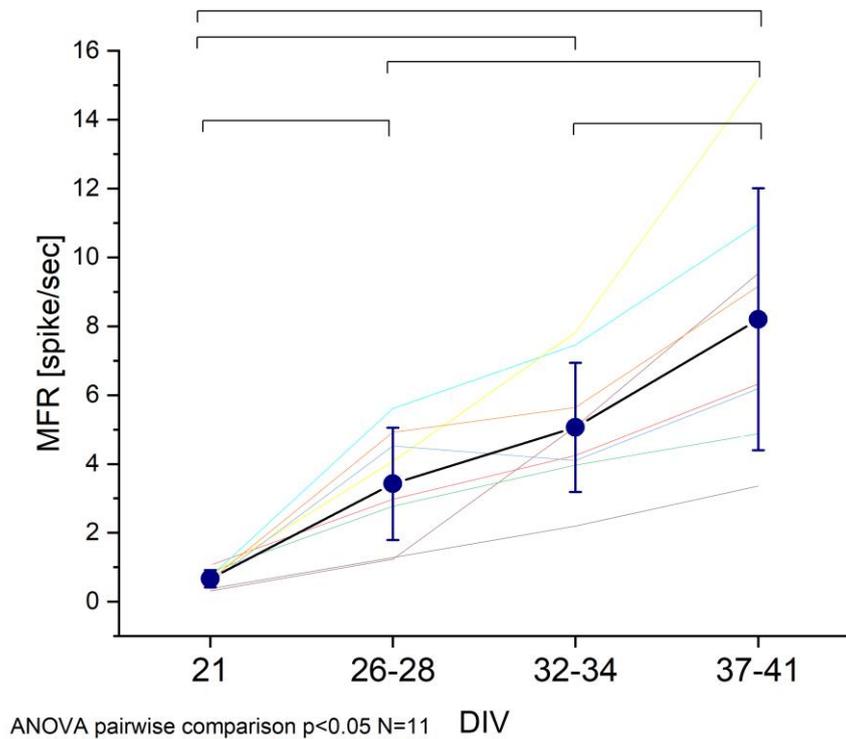


Figure 4.11 Andamento MFR dataset 2D (media campioni in grassetto)

Dal grafico (Figura 4.11) si può vedere una crescita pressoché lineare del MFR che coincide con la maturazione dei campioni e l'aumento della loro attività.

### *Burstiness Index*

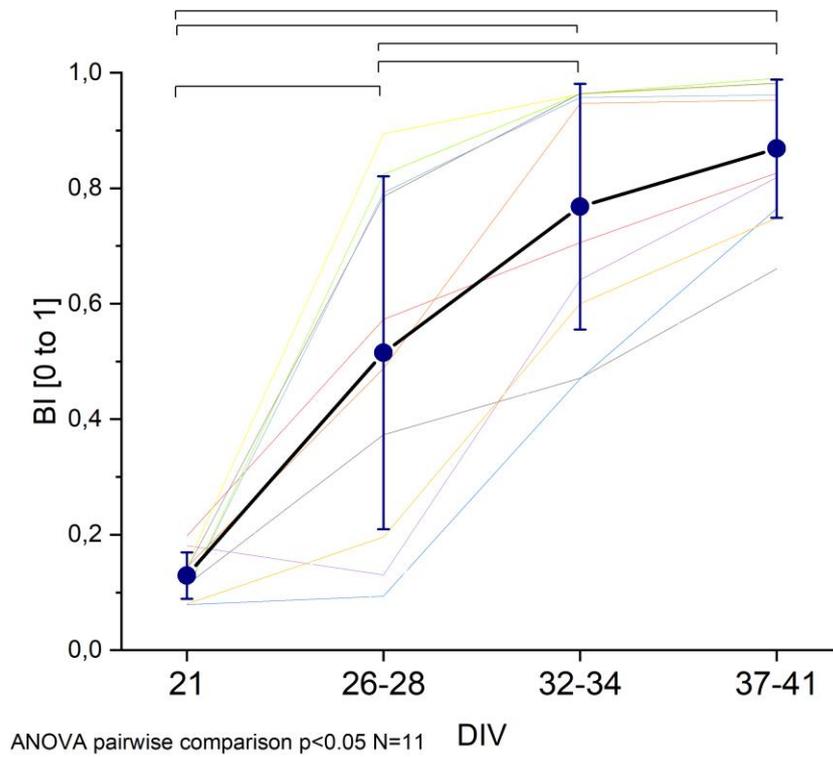


Figure 4.12 Andamento BI dataset 2D (media campioni in grassetto)

Dal grafico (Figura 4.12) si vede che l'attività di bursting aumenta linearmente con la maturazione dei campioni, assumendo infine un comportamento quasi totalmente bursting.

### Mean Bursting Rate

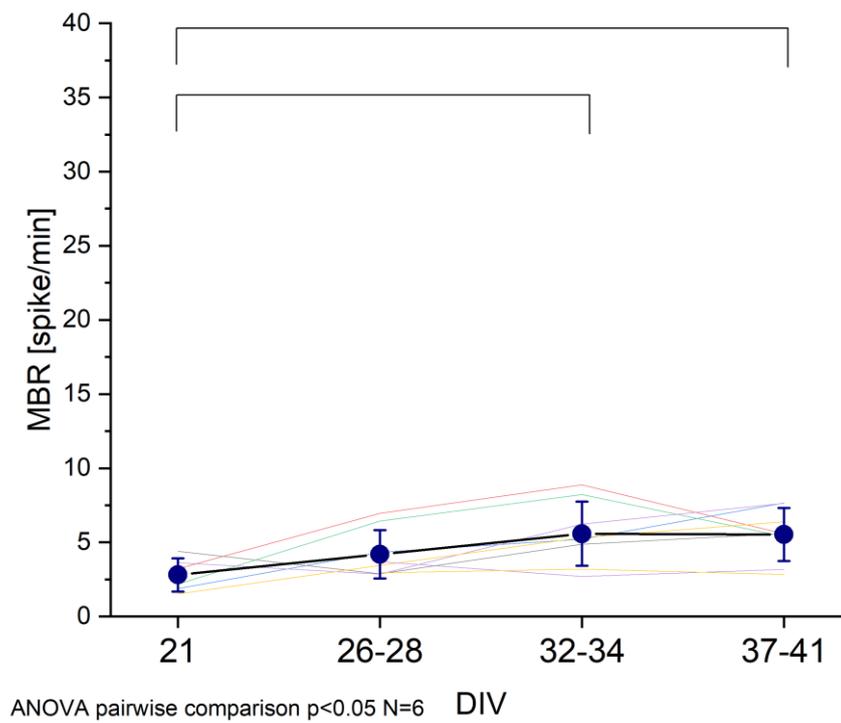


Figure 4.13 Andamento MBR dataset 2D (media campioni in grassetto)

Dal grafico (Figura 4.13) si può vedere che il MBR aumenta leggermente con il passare dei giorni ma non si ha una significativa evoluzione.

### Mean Bursting Duration

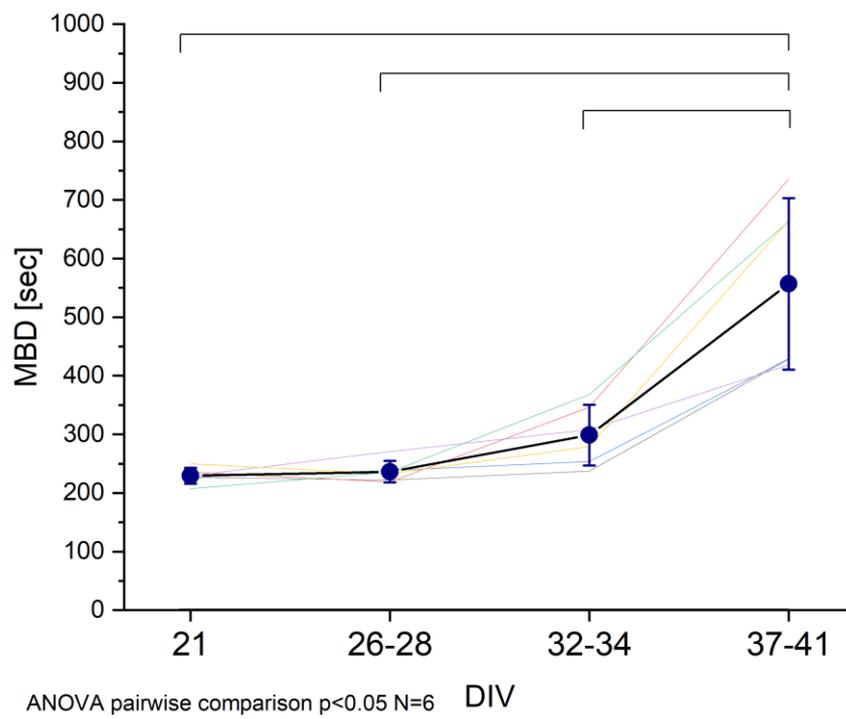


Figure 4.14 Andamento MBD dataset 2D (media campioni in grassetto)

Dal grafico (Figura 4.14) si può vedere che la MBD è quasi costante per le prime tre sessioni per poi aumentare significativamente nell'ultima.

## Random Spikes

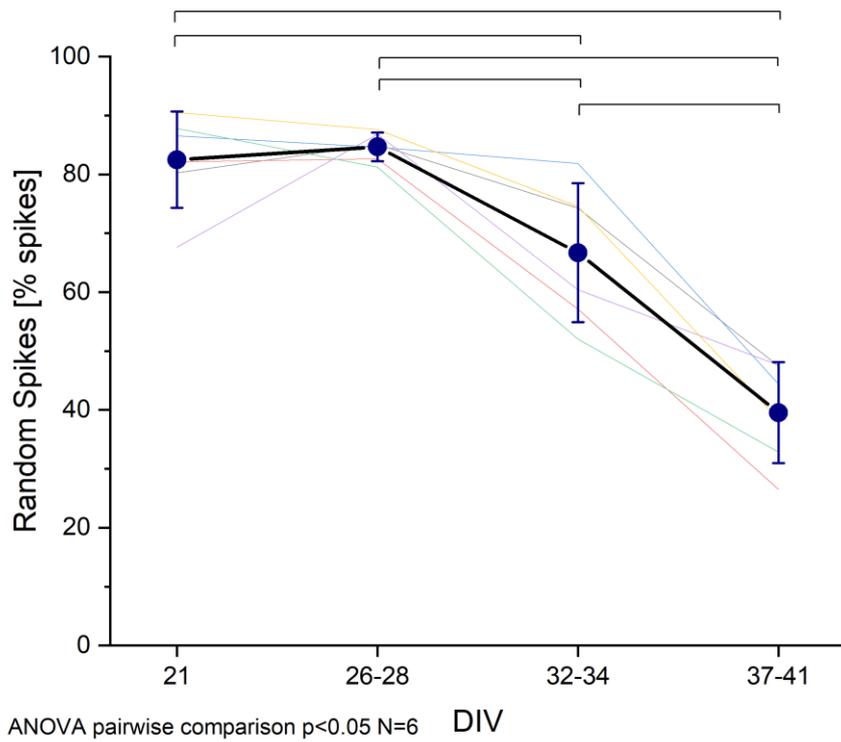


Figure 4.15 Andamento Random Spikes dataset 2D (media campioni in grassetto)

Dal grafico (Figura 4.15) si può vedere che il numero di random spike al di fuori dei burst è quasi costante per le prime due sessioni per poi decrescere significativamente nelle ultime due, indicando un comportamento prevalentemente bursting.

## *Commenti*

Le registrazioni si sono fermate al DIV 41 perchè le matrici servivano per altri esperimenti, non per limitazioni della tecnologia 2D.

Con il passare del tempo si può notare un:

- Aumento considerevole del firing rate
- Passaggio ad un'attività prevalentemente bursting (Burstiness Index tendente ad 1 e percentuale di Random Spike decrescente)
- Iniziale leggera crescita del MBR per poi assestarsi a 5.5
- MBD inizialmente quasi invariato per poi raddoppiare nell'ultima registrazione
- Risultati coerenti con la letteratura

### 4.2.3 Campione 3D

#### Mean Firing Rate

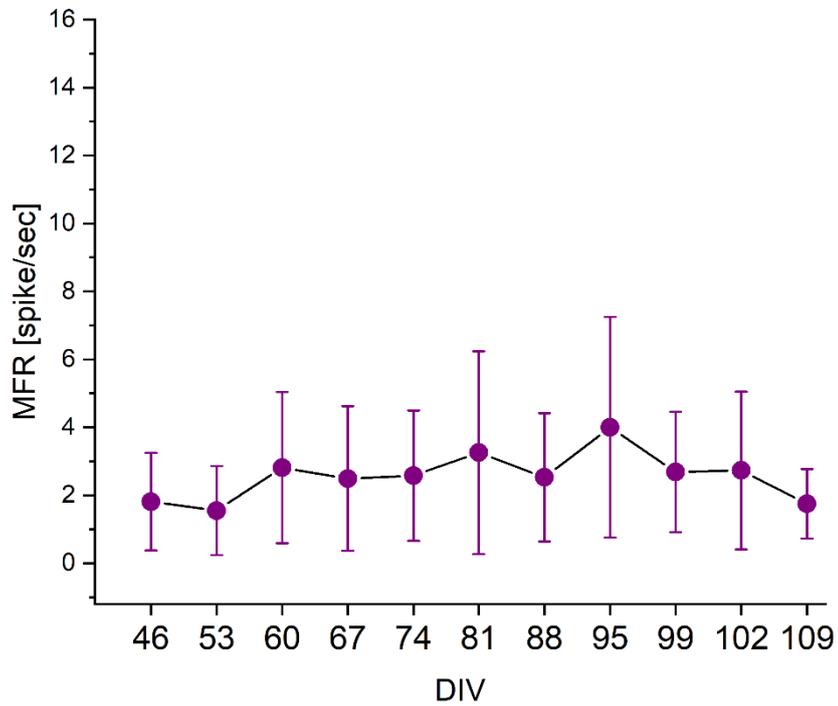


Figure 4.16 Andamento MFR campione 3D

Dal grafico (Figura 4.16) si può vedere una leggera crescita complessiva del MFR, a differenza dei campioni 2D però questa crescita è molto ridotta e complessivamente non si ha una evoluzione dell'attività con il passarsare dei giorni.

### *Burstiness Index*

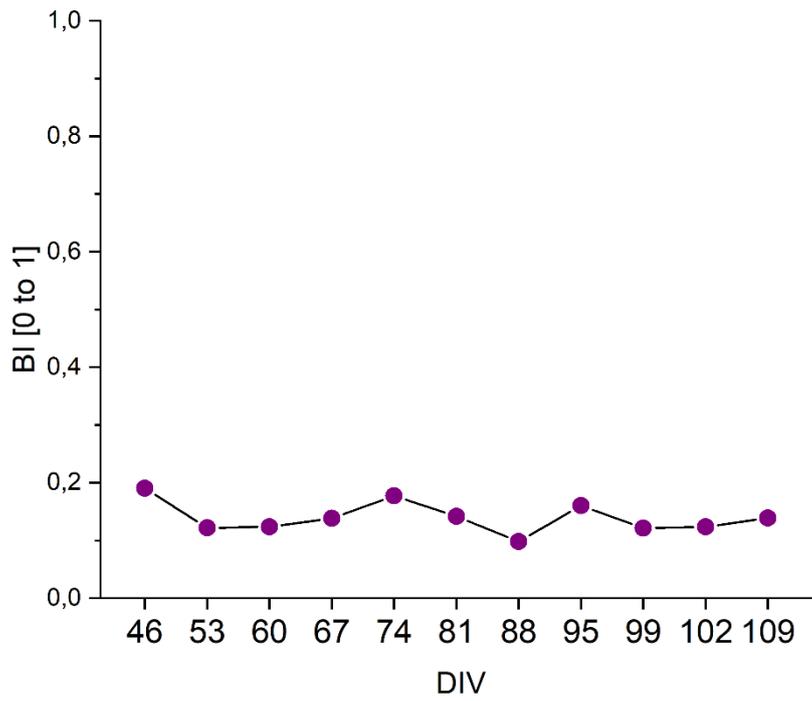


Figure 4.17 Andamento BI campione 3D

Dal grafico (Figura 4.17) si vede che l'attività di bursting a differenza dei campioni 2D si mantiene complessivamente attorno allo stesso valore anche con la maturazione del campione.

### Mean Bursting Rate

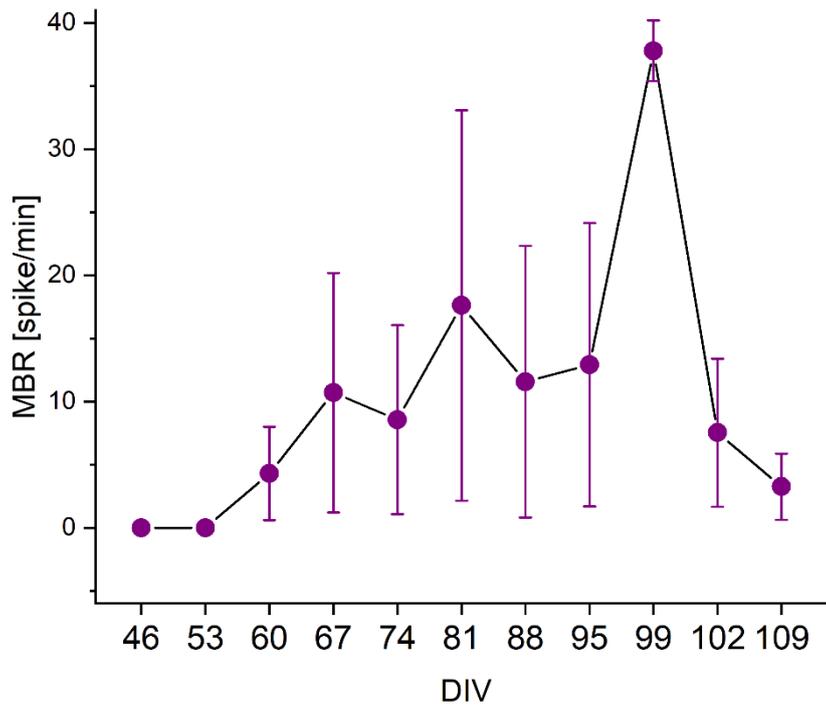


Figure 4.18 Andamento MBR campione 3D

Dal grafico (Figura 4.18) si può vedere che il MBR a differenza dei campioni 2D è poco stabile e cresce a livelli molto alti, tuttavia la varianza è alta, ciò è dato dal fatto che alcuni canali sono molto più attivi di altri.

### *Mean Bursting Duration*

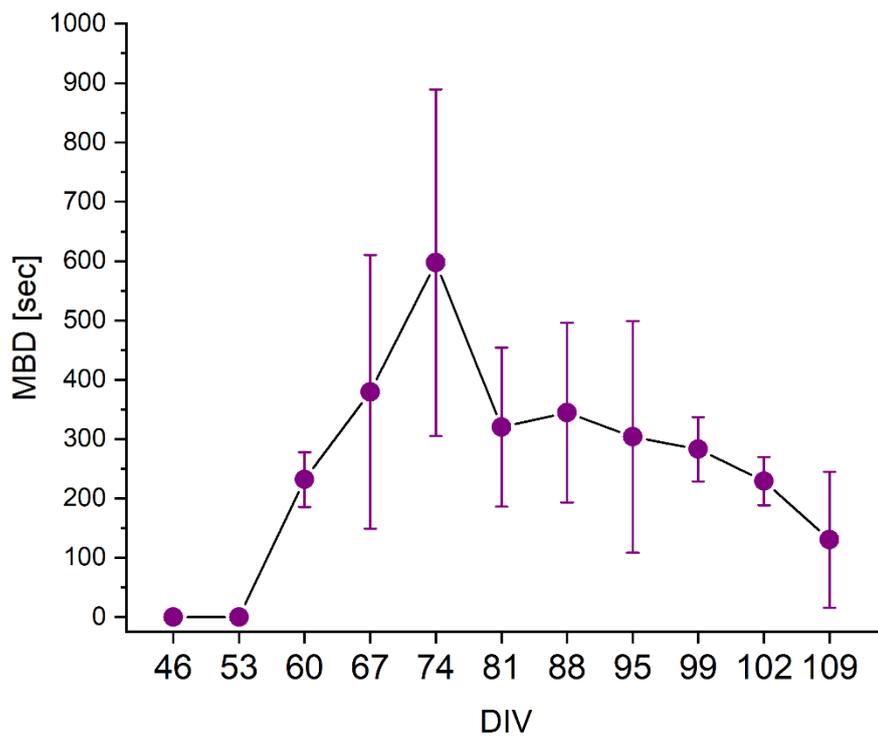


Figure 4.19 Andamento MBD campione 3D

Dal grafico (Figura 4.19) si può vedere che la MBD per le prime tre sessioni cresce ma dal DIV81 cala prima drasticamente e poi decresce più lentamente, tuttavia la varianza è alta, ciò è dato dal fatto che alcuni canali sono molto più attivi di altri.

## Random Spikes

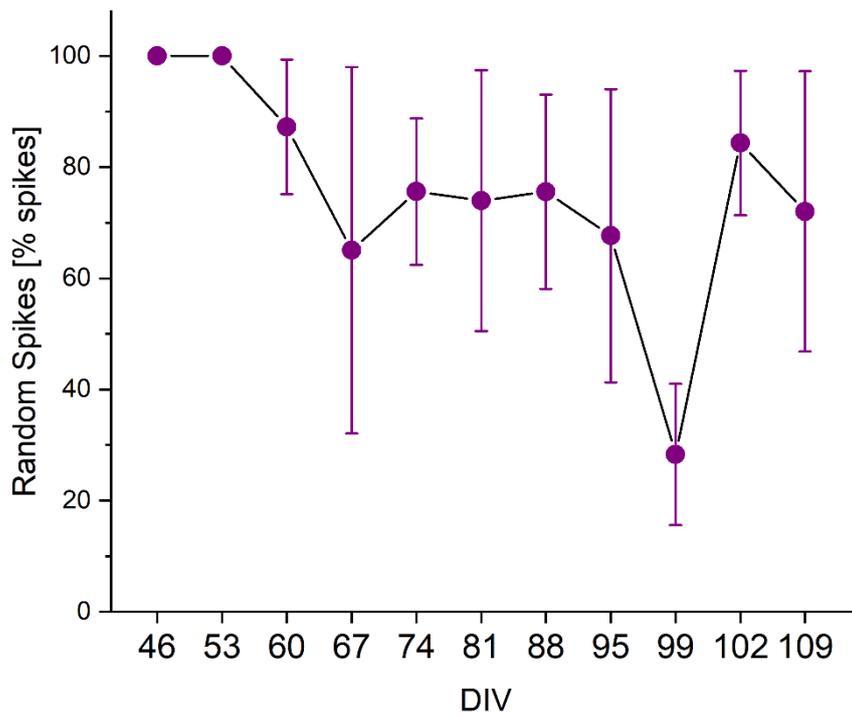


Figure 4.20 Andamento Random Spikes campione 3D

Dal grafico (Figura 4.20) si può vedere che il numero di random spike al di fuori dei burst oscilla intorno agli 80% senza decrescere significativamente nella maturazione del campione, escludendo il DIV99 in cui si nota un crollo dei random spike a circa 30%, che già al DIV102 risalgono a 85%.

### *Commenti*

- Media dei canali
- Attività sotto-soglia fino al DIV 46
- MFR aumenta leggermente ma si mantiene attorno allo stesso valore quindi mancanza di evoluzione,
- Alta varianza data dal fatto che alcuni canali sono particolarmente attivi mentre altri sono poco attivi,
- Bursting frequente ma limitato a una forte minoranza dei canali
- Intensità più bassa dei 2D,
- Registrato per 109 DIV.

#### 4.2.4 Campione 3Dsu2D A

##### Mean Firing Rate

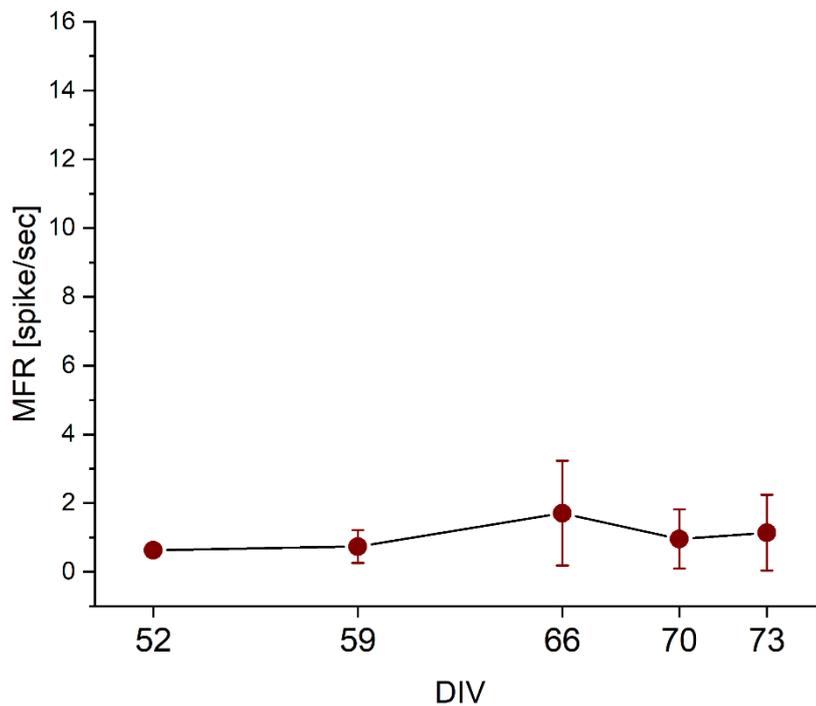


Figure 4.21 Andamento MFR campione 3Dsu2D A

Dal grafico (Figura 4.21) si può vedere una leggerissima crescita complessiva del MFR ma complessivamente non si ha una evoluzione significativa dell'attività con il passare dei giorni.

### *Burstiness Index*

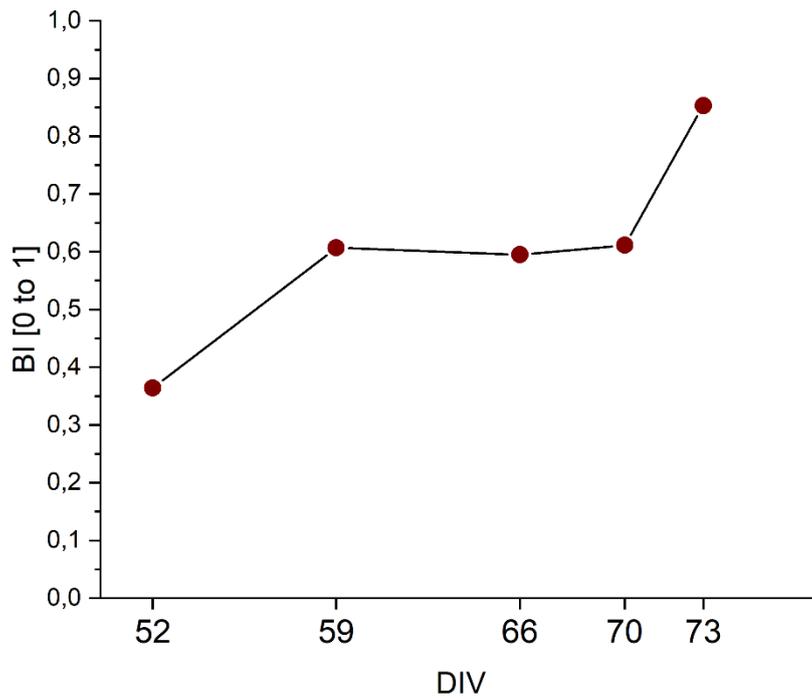


Figure 4.22 Andamento BI campione 3Dsu2D A

Dal grafico (Figura 4.22) si vede che l'attività di bursting è più bassa ma comunque apprezzabile, nelle prime due sessioni di registrazione, per poi aumentare mantenendosi stabile su un BI di circa 0.6 dal DIV59 al DIV70, assumendo infine un comportamento quasi totalmente bursting al DIV73.

### *Mean Bursting Rate*

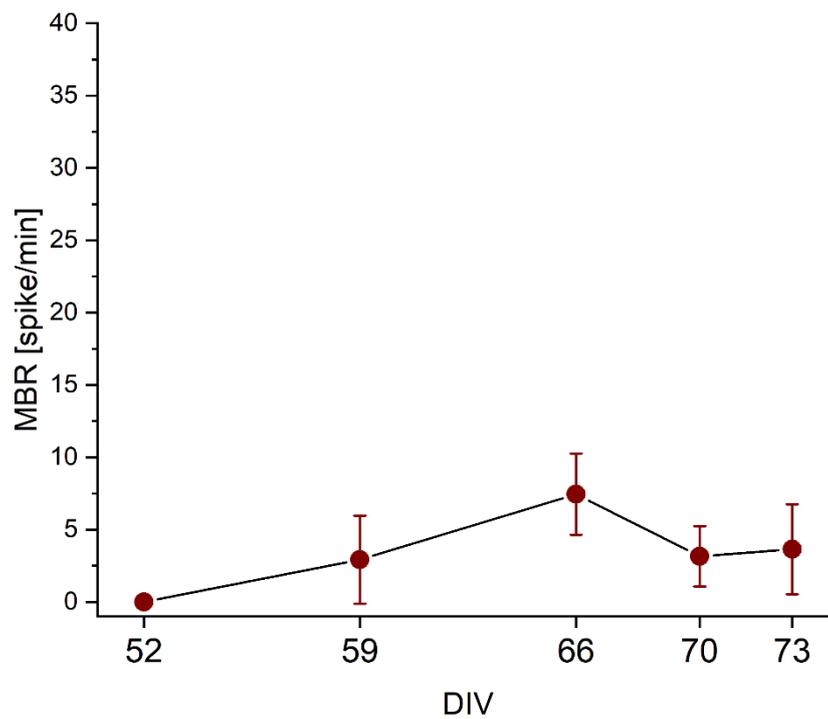


Figure 4.23 Andamento MBR campione 3Dsu2D A

Dal grafico (Figura 4.23) si può vedere una leggera crescita complessiva del MBR ma complessivamente non si ha una evoluzione significativa dell'attività con il passare dei giorni.

### *Mean Bursting Duration*

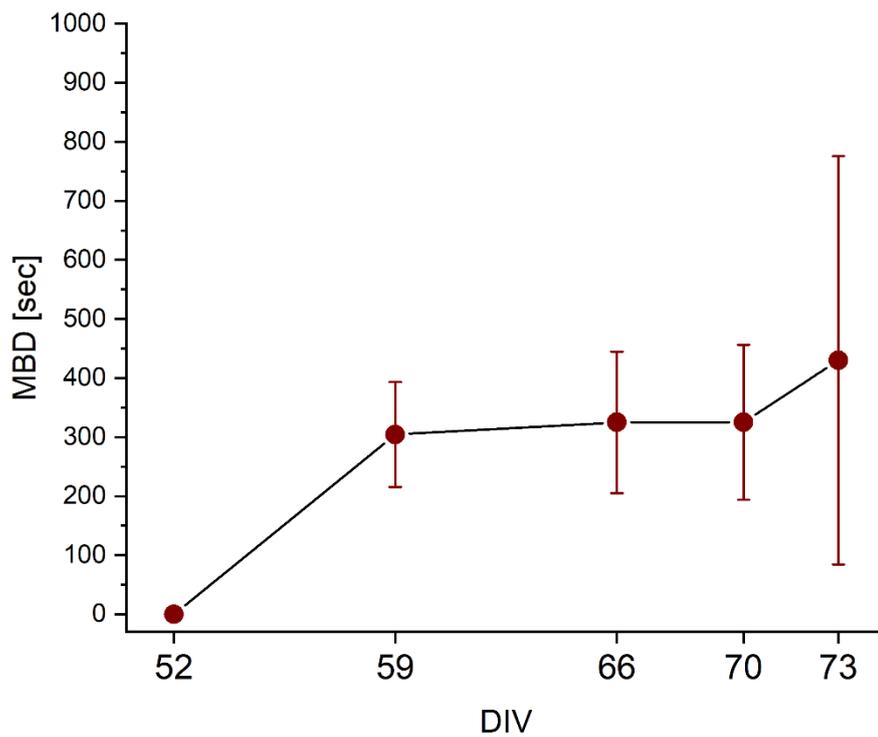


Figure 4.24 Andamento MBD campione 3Dsu2D A

Dal grafico (Figura 4.24) si può vedere una leggera crescita complessiva del MBD ma complessivamente non si ha una evoluzione significativa dell'attività con il passasare dei giorni escludendo quella fra prima e seconda registrazione.

## Random Spikes

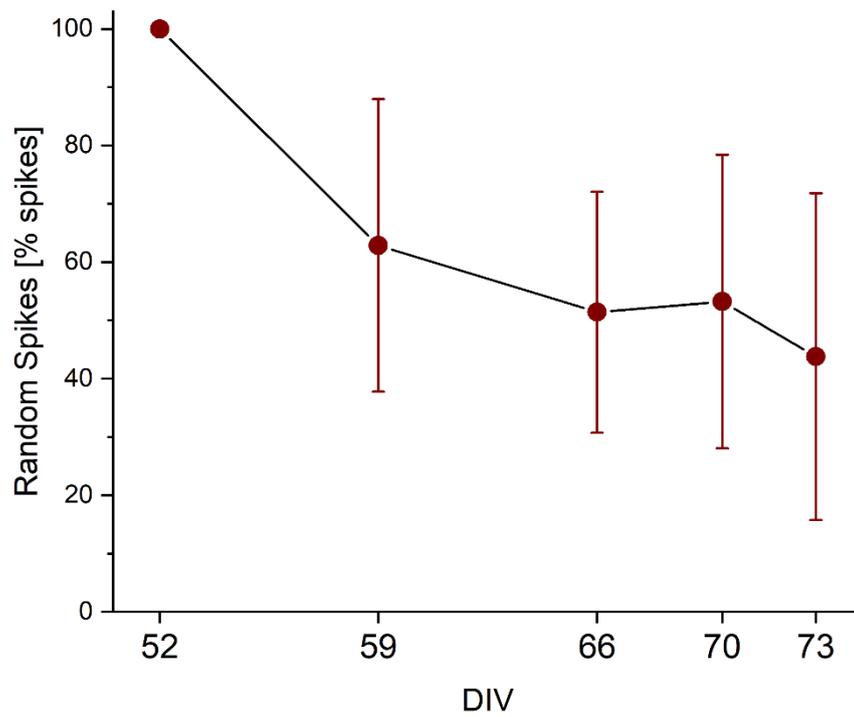


Figure 4.25 Andamento Random Spikes campione 3Dsu2D A

Dal grafico (Figura 4.25) si può vedere che il numero di random spike al di fuori dei burst è in decrescita con la maturazione del campione, indicando un passaggio ad una dinamica prevalentemente bursting.

## *Commenti*

- Media dei canali
- Attività sotto-soglia fino al DIV 52,
- Alta varianza per le misure burst data dal fatto che alcuni canali sono particolarmente attivi mentre altri sono poco attivi,
- Intensità più bassa dei 2D,
- Registrato per 73 DIV,
- Con il passare del tempo:
- MFR aumenta leggermente ma si mantiene attorno allo stesso valore quindi mancanza di evoluzione
- Passaggio ad un'attività quasi totalmente bursting (BI tendente ad 1)

## 4.2.5 Campione 3Dsu2D B

### Mean Firing Rate

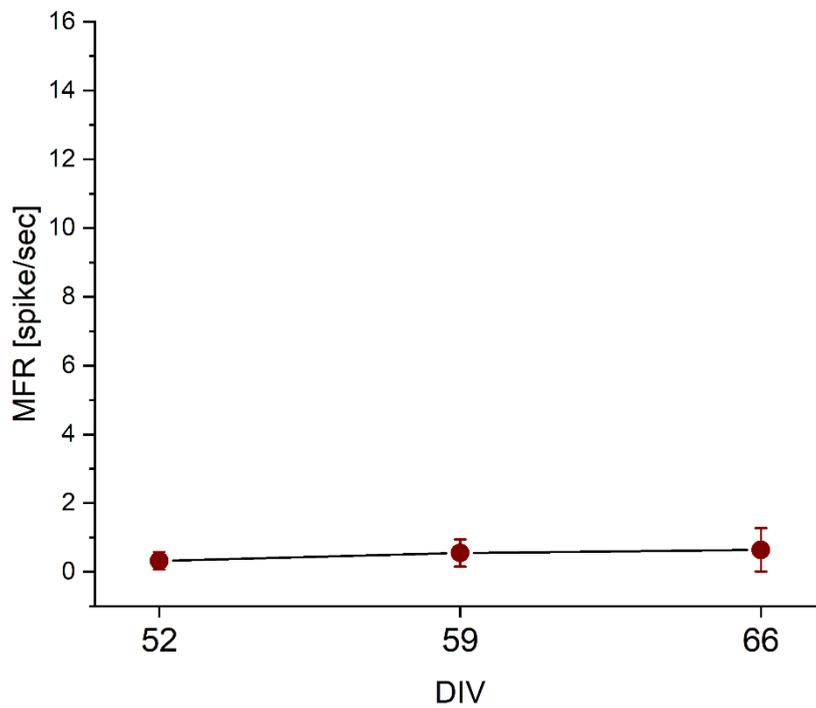


Figure 4.26 Andamento MFR campione 3Dsu2D B

Dal grafico (Figura 4.26) si può vedere una leggerissima crescita complessiva del MFR ma complessivamente non si ha una evoluzione significativa dell'attività con il passare dei giorni.

### *Burstiness Index*

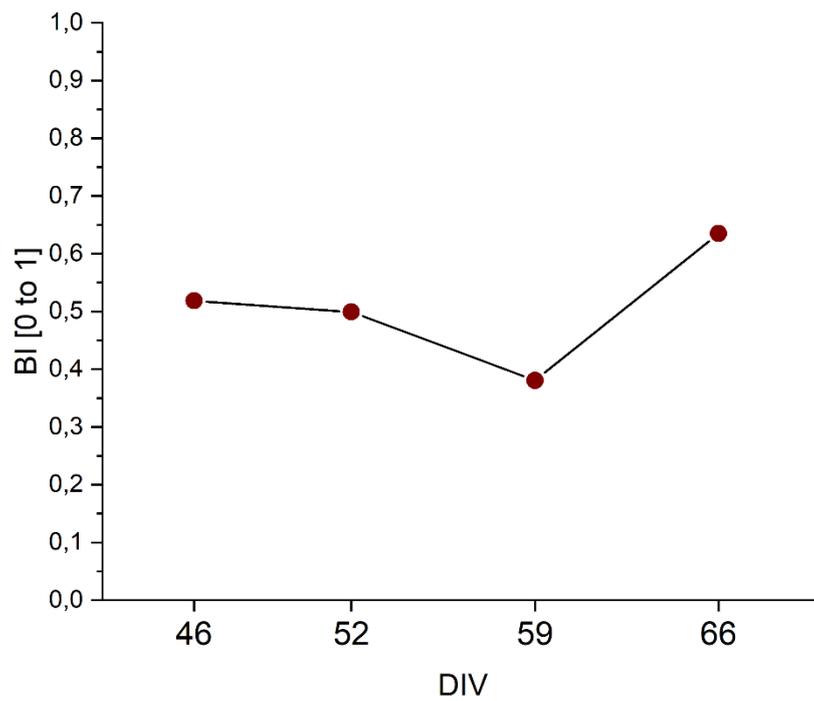


Figure 4.27 Andamento BI campione 3Dsu2D B

Dal grafico (Figura 4.27) si vede che l'attività di bursting a differenza dei campioni 2D è poco stabile ma aumenta leggermente.

### *Mean Bursting Rate*

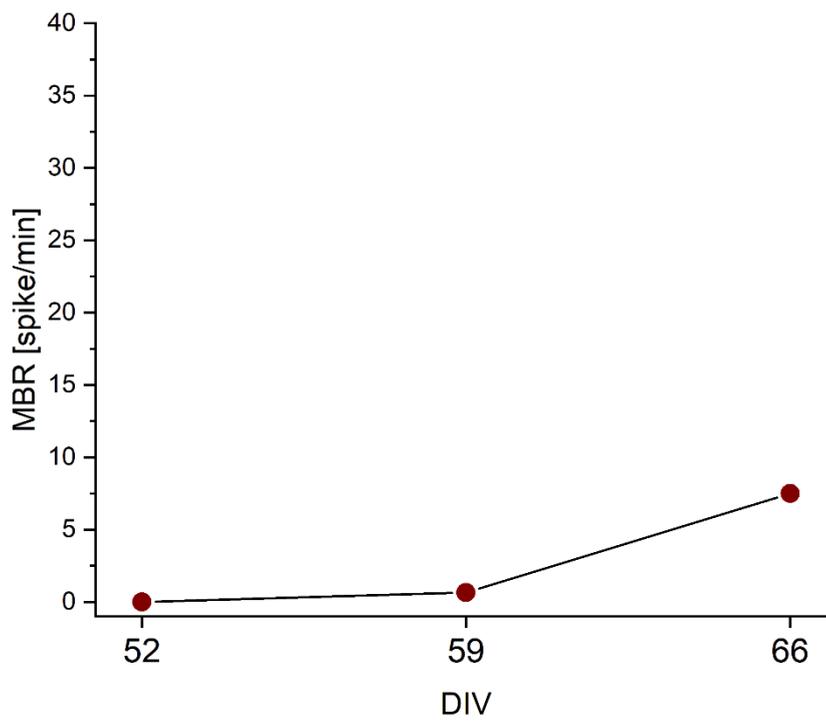


Figure 4.28 Andamento MBR campione 3Dsu2D B

Dal grafico (Figura 4.28) si può vedere che il MBR aumenta significativamente fra DIV59 e DIV66.

### *Mean Bursting Duration*

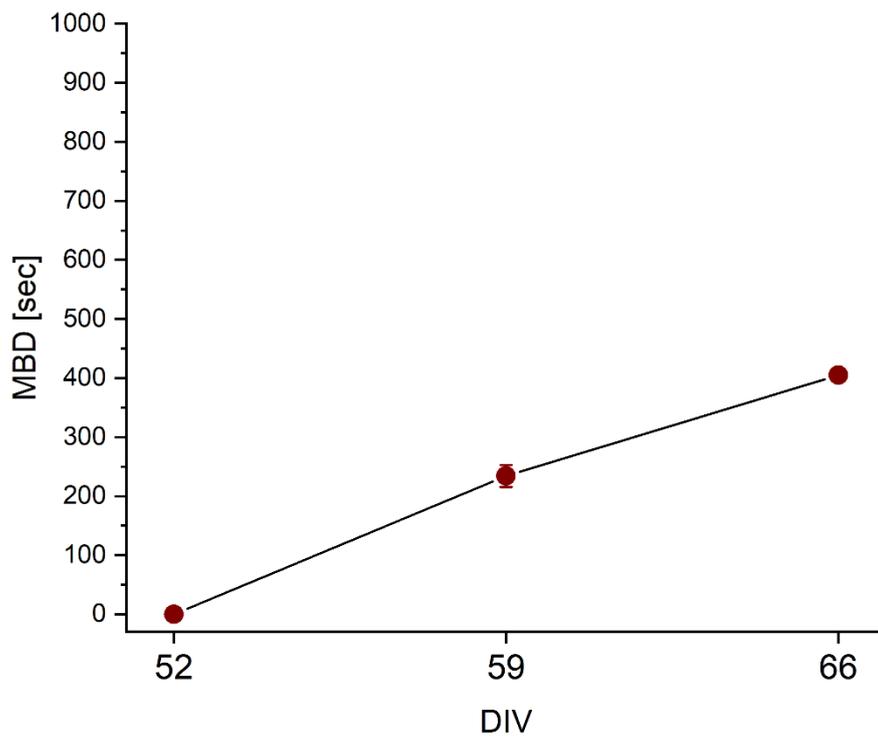


Figure 4.29 Andamento MBD campione 3Dsu2D B

Dal grafico (Figura 4.29) si può vedere che la MBD aumenta significativamente con il passare dei giorni.

### *Random Spikes*

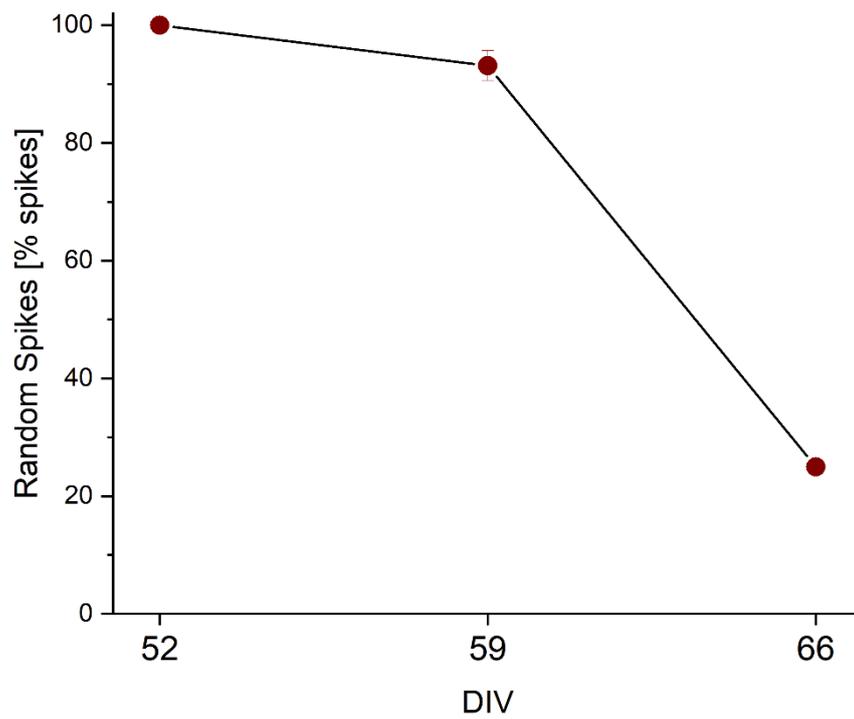


Figure 4.30 Andamento Random Spikes campione 3Dsu2D B

Dal grafico (Figura 4.30) si può vedere che il numero di random spike al di fuori dei burst è in decrescita, indicando una tendenza al comportamento bursting.

## *Commenti*

- Media dei canali
- Attività sotto-soglia fino al DIV 52,
- Intensità più bassa dei 2D,
- Pochissimi canali attivi ma varianza bassa poiché gli altri canali sono sostanzialmente spenti quindi non sono rientrati nella media,
- Registrato per 66 DIV,
- Con il passare del tempo:
  - MFR si mantiene attorno allo stesso valore quindi mancanza di evoluzione
  - Passaggio ad un'attività prevalentemente bursting

## 4.2.6 Campione 3Dsu2D C

### Mean Firing Rate

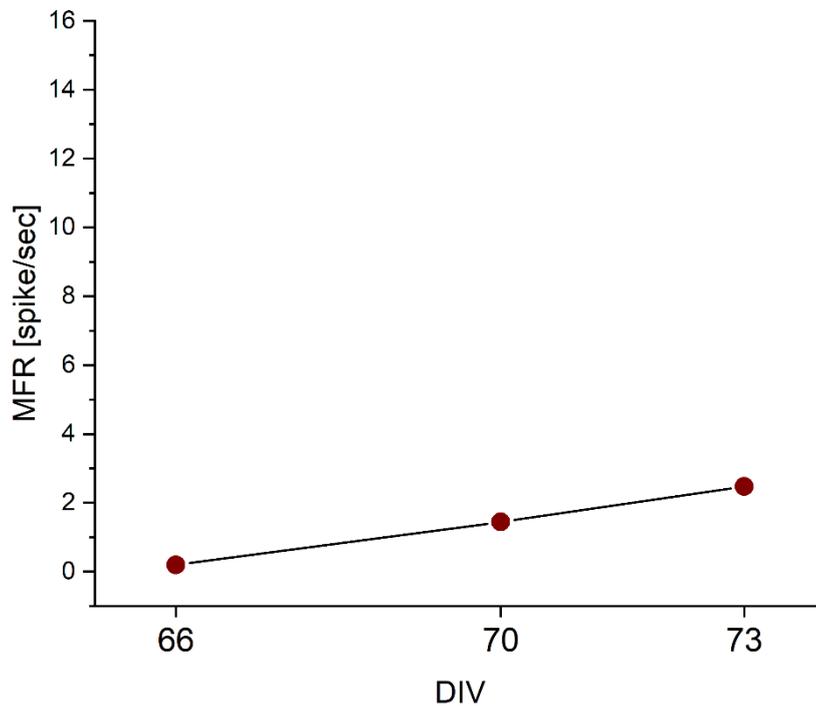


Figure 4.31 Andamento MFR campione 3Dsu2D C

Dal grafico (Figura 4.31) si può vedere una leggera crescita complessiva del MFR ma complessivamente non si ha una evoluzione significativa dell'attività con il passare dei giorni.

### *Burstiness Index*

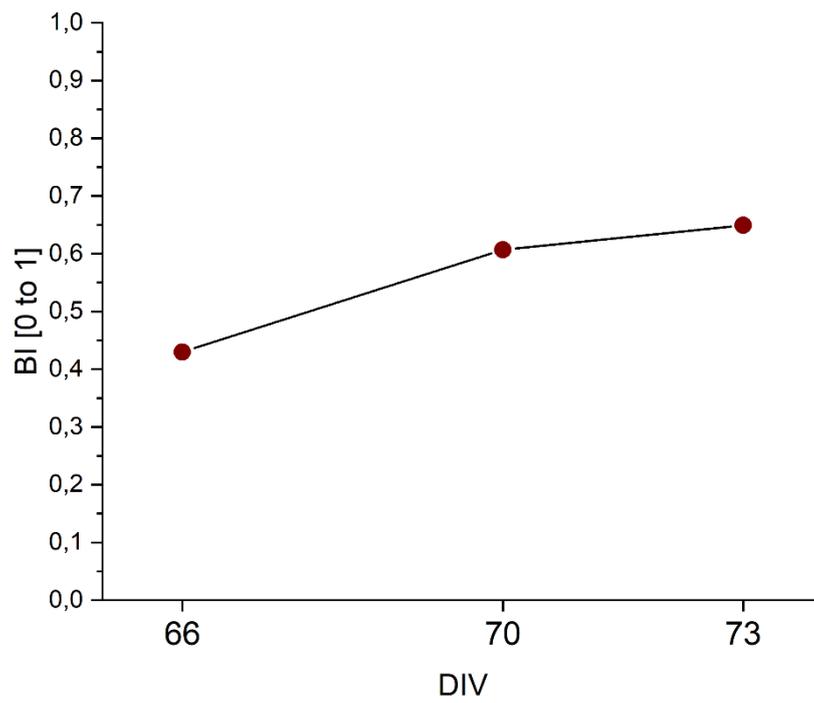


Figure 4.32 Andamento BI campione 3Dsu2D C

Dal grafico (Figura 4.32) si vede che l'attività di bursting aumenta con la maturazione dei campioni.

### *Mean Bursting Rate*

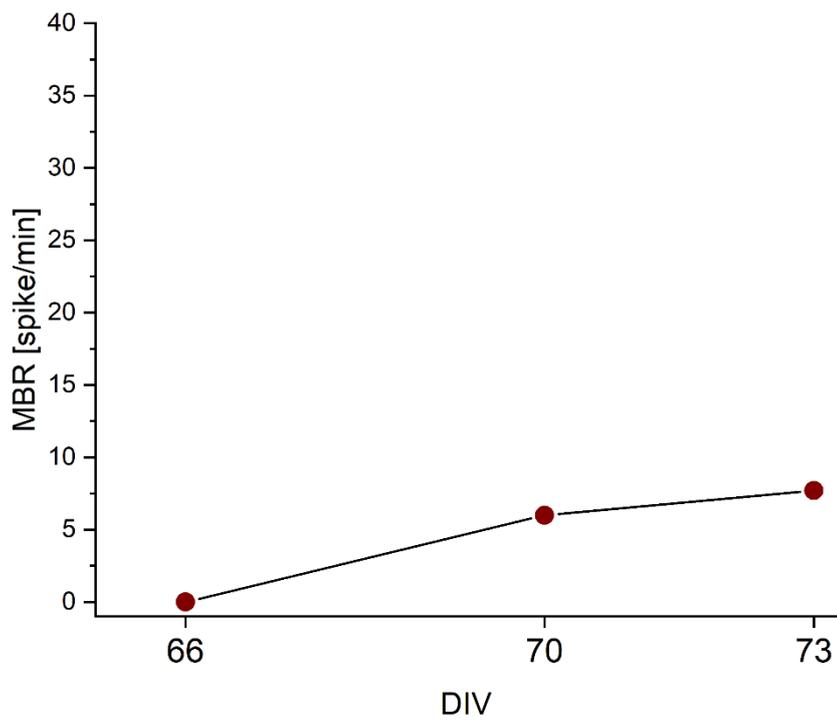


Figure 4.33 Andamento MBR campione 3Dsu2D C

Dal grafico (Figura 4.33) si può vedere che il MBR aumenta significativamente con il passare dei giorni.

### *Mean Bursting Duration*

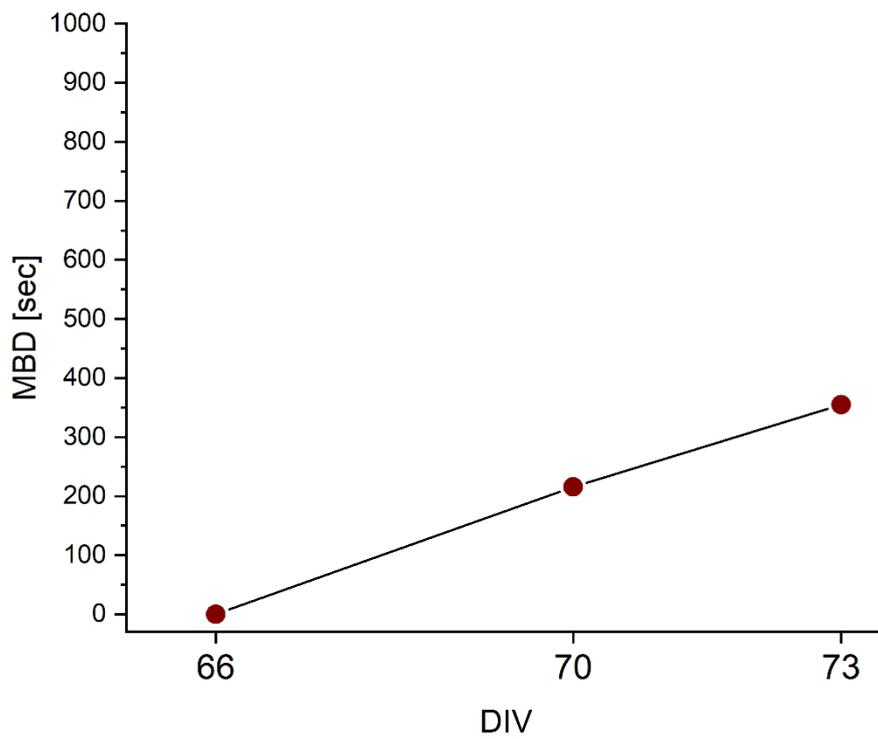


Figure 4.34 Andamento MBD campione 3Dsu2D C

Dal grafico (Figura 4.34) si può vedere che la MBD aumenta significativamente con il passare dei giorni.

### *Random Spikes*

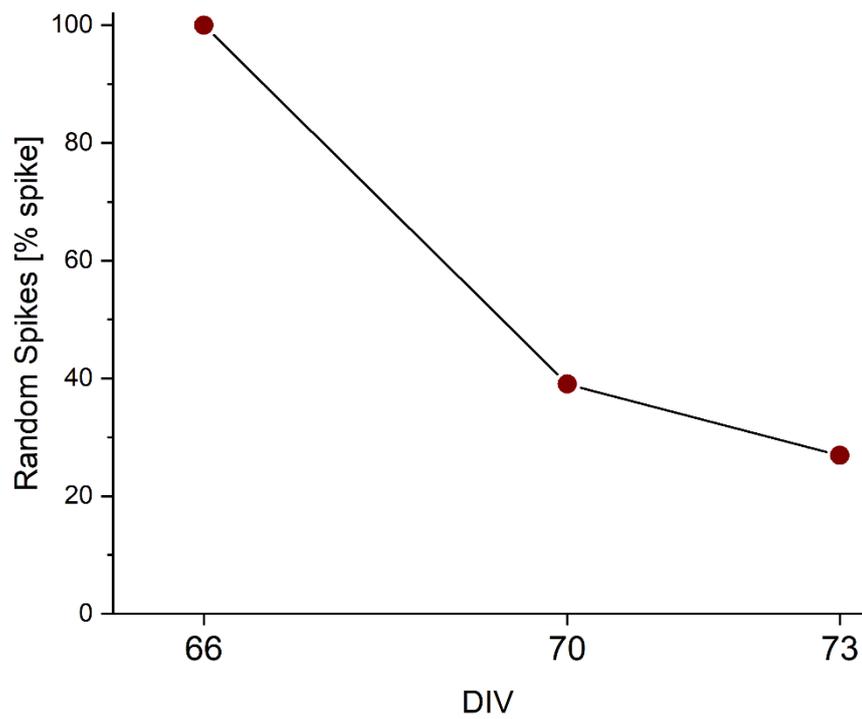


Figure 4.35 Andamento Random Spikes campione 3Dsu2D C

Dal grafico (Figura 4.35) si può vedere che il numero di random spike al di fuori dei burst è in decrescita, indicando una tendenza al comportamento bursting.

### *Commenti*

- Media dei canali
- Attività sotto-soglia fino al DIV 66
- Pochissimi canali attivi ma varianza bassa poiché gli altri canali sono sostanzialmente spenti quindi non sono rientrati nella media,
- Intensità più bassa dei 2D,
- Registrato per 73 DIV,
- Con il passare del tempo:
  - MFR aumenta leggermente ma complessivamente manca di evoluzione
  - Passaggio ad un'attività prevalentemente bursting

### 4.3 Analisi Morfologica

Tutte le colture 3Dsu2D in esame sono state fissate mediante PFA e su ciascuna è stata effettuata una marcatura attraverso la tecnica dell'immunofluorescenza per poterne valutare le caratteristiche morfologiche.

Le componenti cellulari che sono state messe in evidenza sono: il citoscheletro neuronale attraverso marcatore Tub $\beta$ III, la proteina fibrillare acida della glia mediante GFAP ed i nuclei utilizzando DAPI. Tutte le colture sono state osservate a tre diversi ingrandimenti: 10x, 20x, 50x.

Dalle immagini (Figura 4.36) si può notare come le cellule neuronali tendono a migrare verso gli strati superiori lasciando lo strato a contatto con gli elettrodi scoperto da neuroni, questa può essere una possibile ragione per la scarsa performance elettrofisiologica dei modelli 3Dsu2D, dato che nonostante si siano formate delle reti tridimensionali neuronali (marcate in Tub $\beta$ III/verde) e gliali (marcate in GFAP/rosso), visibili anche nelle immagini (Figura 4.6), l'attività funzionale spontanea non viene registrata dagli elettrodi. A supporto di questo si nota come nei modelli su MEA3D, i cui elettrodi ad ago riescono a raggiungere gli strati più superiori, l'attività spontanea è considerevolmente maggiore, seppur instabile.

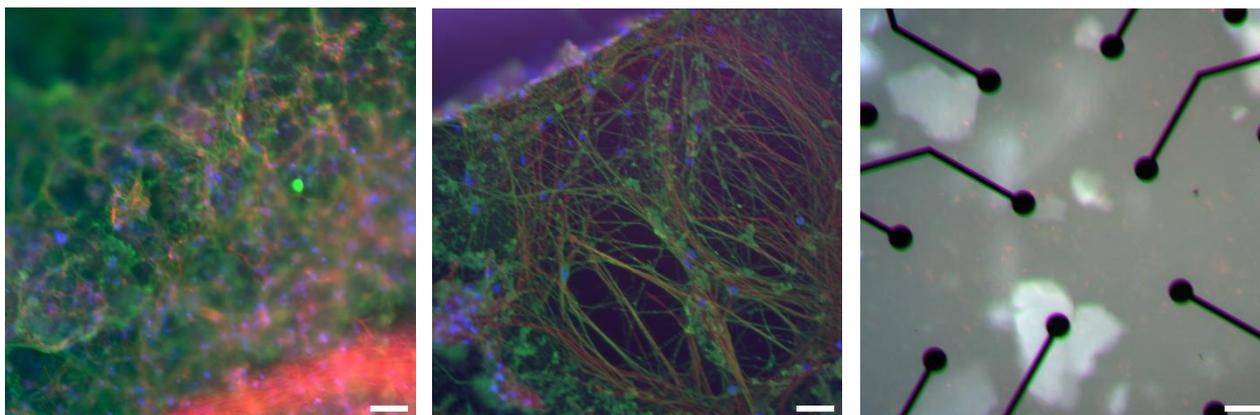


Figure 4.36 Immagini ottenute tramite microscopia ottica in fluorescenza. Le immagini sono state acquisite con un ingrandimento 10x e le colture marcate a DIV 73 con Tub $\beta$ III (verde), GFAP(rosso) e Dapi (blu). Scale bar 50  $\mu$ m.

# Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stato quello di costruire e caratterizzare reti 2D e 3D *in vitro* composte da neuroni, differenziati da cellule staminali pluripotenti indotte umane (h-iPSC), in co-cultura con astrociti corticali di ratto. In particolare sono state esplorate diverse opzioni di modelli e metodologie di acquisizione dell'attività elettrofisiologica delle reti: colture 2D su MEA2D, colture 3D su MEA2D e colture 3D su MEA3D.

La prima parte di questo progetto ha compreso la registrazione e l'analisi dell'attività elettrofisiologica basale delle varie tipologie di colture. L'acquisizione dei dati è avvenuta applicando il protocollo di registrazione descritto in 2.2.3. I dati delle registrazioni sono stati elaborati ed è stata condotta prima un'analisi qualitativa seguita da una quantitativa:

- Per l'analisi qualitativa sono stati prodotti grafici rasterplot dai quali si è evidenziata una netta differenza nell'attività delle colture. In particolare le colture 2D mostrano una maggiore attività portando ad una maturazione più veloce rispetto alle colture 3D ed in particolare 3Dsu2D.
- Nell'analisi quantitativa sono stati confermati i risultati precedenti. I parametri analizzati per le colture 2D mostrano un progressivo aumento del MFR a partire già dal DIV 21, con un conseguente passaggio ad un'attività prevalentemente bursting. Per le colture 3D, il numero dei canali attivi è relativamente basso e non si registra attività sopra soglia prima del DIV 46; il MFR ha valori comparabili a quelli delle colture 2D senza però che se ne osservi un'aumento nel tempo; in contrasto sia frequenza che durata dei burst aumentano fino a raggiungere livelli molto più alti delle colture 2D. Per le colture 3Dsu2D molti dei campioni non hanno mostrato attività sopra soglia.

La seconda parte del lavoro è stata dedicata alla caratterizzazione morfologica delle colture 3Dsu2D per verificare se la loro scarsa performance elettrofisiologica derivasse dal mancato sviluppo di reti tridimensionali. Grazie alla tecnica dell'immunofluorescenza utilizzata è emerso che:

- Lo scaffold ha sostenuto lo sviluppo e la formazione di una rete tridimensionale densa e altamente connessa morfologicamente, sia dalla parte delle cellule neuronali che delle cellule gliali.

- Le cellule piastrate sulla superficie del MEA sono migrate verso gli strati superiori dell'idrogel, prediligendo un supporto più “*soft*” rispetto al vetro e perdendo completamente il contatto con gli elettrodi.

In conclusione si può affermare che al momento i metodi di sviluppo e caratterizzazione elettrofisiologica delle colture 3D rappresentati in questa tesi presentano delle criticità: maturazione più lenta, minore attività, alta varianza, pochi canali attivi; i MEA3D appaiono più promettenti, specialmente per quanto riguarda la percentuale di colture attive, ma risultano essere più costosi e presentano sempre il limite della registrazione a livello di un singolo piano della coltura e non di vari strati contemporaneamente.

Bisogna tuttavia distinguere quali di queste criticità si possano alleviare con dei protocolli di sviluppo della coltura differenti e quali invece siano caratteristiche intrinseche della tecnologia 3D.

Una possibile via è sperimentare con diverse concentrazioni di cellule neuronali e, nel caso 3Dsu2D, anche diverse concentrazioni di fattore di adesione e idrogelo, per fare in modo che le cellule non tendano a migrare verso gli strati superiori, oppure utilizzare o meglio sviluppare una tecnologia innovativa che possa essere accoppiata con colture 3D e che sia in grado di registrare effettivamente l'attività funzionale contemporaneamente da diverse altezze della coltura, offrendo così un'informazione realistica e completa dei modelli in studio.

# Appendice

## Esperimenti con sonde da *In Vivo*

È stata valutata ed esplorata la possibilità di utilizzare un sistema di acquisizione basato su sonde, tipicamente utilizzate per le registrazioni *in vivo*, in grado di penetrare le colture 3D.

In particolare sono state utilizzate sonde Neuronexus A4x4-3mm-50-125-177 (Figura A.1), il setup di acquisizione completo (Figura A.2) comprendeva inoltre un termostato ed una cameretta per il controllo atmosferico, similmente alle colture registrate su MEA.

La sonda è stata inserita a diverse profondità per sondare le colture su più livelli, tuttavia è stato impossibile acquisire qualsiasi attività per via dell'altissimo rumore, probabilmente dato dalla soluzione non ottimale di ground: un filo d'argento posto a contatto con il terreno della coltura.

Una possibile soluzione è sviluppare le colture su MEA3D e sfruttare i pin dei MEA come ground, in modo da avere un segnale più pulito, tuttavia si introduce così il rischio di contatto fra gli elettrodi di MEA e sonda Neuronexus, il che data la loro fragilità conseguirebbe nel probabile danneggiamento di entrambi.

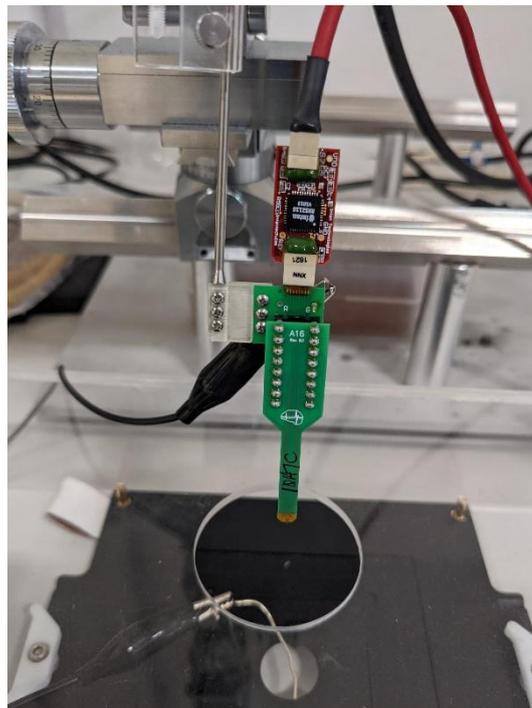


Figure A.1 Sonda Neuronexus A4x4-3mm-50-125-177

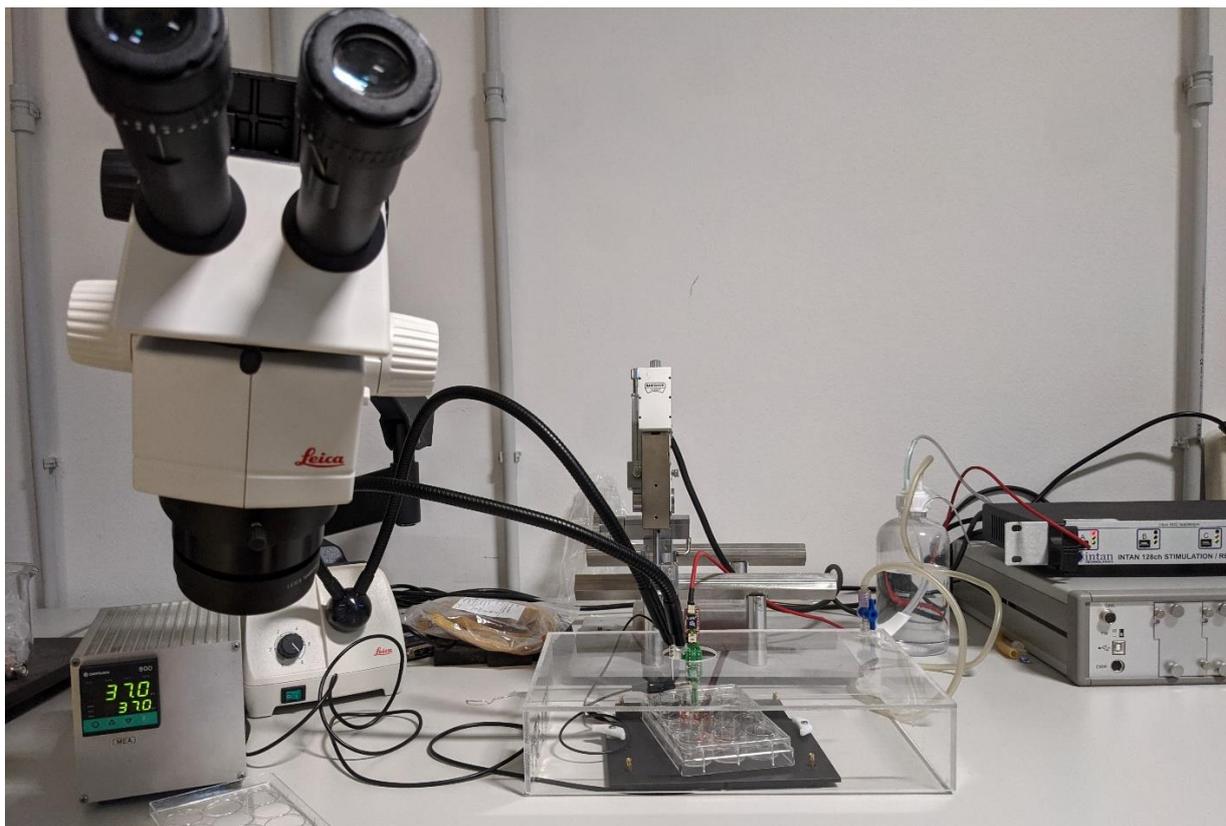


Figure A.2 Setup di acquisizione con sonda Neuronexus completo

# Bibliografia

- Amiri, M., Hosseinmardi, N., Bahrami, F., & Janahmadi, M. (2013). Astrocyte- neuron interaction as a mechanism responsible for generation of neural synchrony: A study based on modeling and experiments. *Journal of Computational Neuroscience*, 34(3). <https://doi.org/10.1007/s10827-012-0432-6>
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: Glia, the unacknowledged partner. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 22, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01349-6)
- Avoli, M., D'Antuono, M., Louvel, J., Köhling, R., Biagini, G., Pumain, R., D'Arcangelo, G., & Tancredi, V. (2002). Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 68, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00077-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00077-1)
- Bano, I., Arshad, M., Yasin, T., Ghauri, M. A., & Younus, M. (2017). Chitosan: A potential biopolymer for wound management. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 102). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047>
- Bazargani, N., & Attwell, D. (2016). Astrocyte calcium signaling: The third wave. In *Nature Neuroscience* (Vol. 19, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2015). Neuroscience: Exploring the brain: Fourth edition. In *Neuroscience: Exploring the Brain: Fourth Edition*.
- Bear, M. F., & Malenka, R. C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current Opinion in Neurobiology*, 4(3). [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0959-4388(94)90101-5)
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. In *Nature* (Vol. 361, Issue 6407). <https://doi.org/10.1038/361031a0>
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>

- Bologna, L. L., Pasquale, V., Garofalo, M., Gandolfo, M., Baljon, P. L., Maccione, A., Martinoia, S., & Chiappalone, M. (2010). Investigating neuronal activity by SPYCODE multi-channel data analyzer. *Neural Networks*, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2010.05.002>
- Boyle, J. (2005). Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>
- Buwalda, S. J., Boere, K. W. M., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Vermonden, T., & Hennink, W. E. (2014). Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 190). <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>
- Buzsáki, G. (2006). Rhythms of the brain. *Oxford University Press*.
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. In *Neuron* (Vol. 33, Issue 3). [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00586-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00586-X)
- Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., & Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Experimental Neurology*, 172(2). <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7832>
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., & Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. In *World Journal of Stem Cells* (Vol. 11, Issue 12). <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>
- Chiappalone, M., Bove, M., Vato, A., Tedesco, M., & Martinoia, S. (2006). Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Research*, 1093(1). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.049>
- Cui, J., Xu, L., Bressler, S. L., Ding, M., & Liang, H. (2008). BSMART: A Matlab/C toolbox for analysis of multichannel neural time series. *Neural Networks*, 21(8). <https://doi.org/10.1016/j.neunet.2008.05.007>
- Day, J. J., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic Mechanisms in Cognition. In *Neuron* (Vol. 70, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.019>

- De Masi, A., Tonazzini, I., Masciullo, C., Mezzena, R., Chiellini, F., Puppi, D., & Cecchini, M. (2019). Chitosan films for regenerative medicine: fabrication methods and mechanical characterization of nanostructured chitosan films. In *Biophysical Reviews* (Vol. 11, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00591-6>
- Di Lisa, D., Muzzi, L., Pepe, S., Dellacasa, E., Frega, M., Fassio, A., Martinoia, S., & Pastorino, L. (2022). On the way back from 3D to 2D: Chitosan promotes adhesion and development of neuronal networks onto culture supports. *Carbohydrate Polymers*, 297. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120049>
- Di Lisa, D., Tedesco, M., Dellacasa, E., Pesce, M., Catelani, T., Massobrio, P., Raiteri, R., Martinoia, S., & Pastorino, L. (2020). Chitosan biopolymer: Alternative adhesion factor and scaffold matrix for 2D and 3D neuronal cultures. *Biomedical Science and Engineering*, 3(s3). <https://doi.org/10.4081/bse.2019.107>
- Diekelmann, S., & Born, J. (2010). The memory function of sleep. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 11, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/nrn2762>
- Dudek, S. M., & Bear, M. F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4363>
- Egert, U., Knott, T., Schwarz, C., Nawrot, M., Brandt, A., Rotter, S., & Diesmann, M. (2002). MEA-Tools: An open source toolbox for the analysis of multi-electrode data with MATLAB. *Journal of Neuroscience Methods*, 117(1). [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00045-6)
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>
- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. In *Science* (Vol. 330, Issue 6005). <https://doi.org/10.1126/science.1190928>
- Geckil, H., Xu, F., Zhang, X., Moon, S., & Demirci, U. (2010). Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. In *Nanomedicine* (Vol. 5, Issue 3). <https://doi.org/10.2217/nnm.10.12>

- Georges, P. C., & Janmey, P. A. (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. In *Journal of Applied Physiology* (Vol. 98, Issue 4). <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01121.2004>
- Gomi, H., Yokoyama, T., & Itohara, S. (2010). Role of GFAP in morphological retention and distribution of reactive astrocytes induced by scrapie encephalopathy in mice. *Brain Research*, 1312. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.025>
- Guan, X., Avci-Adali, M., Alarçin, E., Cheng, H., Kashaf, S. S., Li, Y., Chawla, A., Jang, H. L., & Khademhosseini, A. (2017). Development of hydrogels for regenerative engineering. In *Biotechnology Journal* (Vol. 12, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/biot.201600394>
- Hagg, T., Muir, D., Engvall, E., Varon, S., & Manthorpe, M. (1989). Laminin-like antigen in rat CNS neurons: Distribution and changes upon brain injury and nerve growth factor treatment. *Neuron*, 3(6). [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90241-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90241-9)
- Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P., & Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, 1(5). <https://doi.org/10.1002/ar.1090010503>
- Hatten, M. E., Furie, M. B., & Rifkin, D. B. (1982). Binding of developing mouse cerebellar cells to fibronectin: A possible mechanism for the formation of the external granular layer. *Journal of Neuroscience*, 2(9). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.02-09-01195.1982>
- Hirano, S. (1996). Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnology Annual Review*, 2(C). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(08\)70012-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(08)70012-7)
- Hughes, S. W., Blethyn, K. L., Cope, D. W., & Crunelli, V. (2002). Properties and origin of spikelets in thalamocortical neurones in vitro. *Neuroscience*, 110(3). [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00577-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00577-2)
- Kamioka, H., Maeda, E., Jimbo, Y., Robinson, H. P. C., & Kawana, A. (1996). Spontaneous periodic synchronized bursting during formation of mature patterns of connections in cortical cultures. *Neuroscience Letters*, 206(2–3). [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)12448-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)12448-4)

- Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. In *Biotechnology Advances* (Vol. 26, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>
- Li, L., Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A. C., Nodin, C., Ståhlberg, A., Aprico, K., Larsson, K., Yabe, T., Moons, L., Fotheringham, A., Davies, I., Carmeliet, P., Schwartz, J. P., Pekna, M., Kubista, M., Blomstrand, F., ... Pekny, M. (2008). Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(3). <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600546>
- Maccione, A., Gandolfo, M., Massobrio, P., Novellino, A., Martinoia, S., & Chiappalone, M. (2009). A novel algorithm for precise identification of spikes in extracellularly recorded neuronal signals. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(1). <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.09.026>
- Malenka, R. C., & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: An embarrassment of riches. In *Neuron* (Vol. 44, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Marom, S., & Shahaf, G. (2002). Development, learning and memory in large random networks of cortical neurons: Lessons beyond anatomy. In *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 35, Issue 1). <https://doi.org/10.1017/S0033583501003742>
- Mayer, M. L. (2005). Glutamate receptor ion channels. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 15, Issue 3 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.05.004>
- Mayorquin, L. C., Rodriguez, A. v., Sutachan, J. J., & Albarracín, S. L. (2018). Connexin-mediated functional and metabolic coupling between astrocytes and neurons. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00118>
- Miller, E. K., & Wilson, M. A. (2008). All My Circuits: Using Multiple Electrodes to Understand Functioning Neural Networks. In *Neuron* (Vol. 60, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.033>
- Mölle, M., Marshall, L., Fehm, H. L., & Born, J. (2002). EEG theta synchronization conjoined with alpha desynchronization indicate intentional encoding. *European Journal of Neuroscience*, 15(5). <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01921.x>

- Mota, J., Yu, N., Caridade, S. G., Luz, G. M., Gomes, M. E., Reis, R. L., Jansen, J. A., Frank Walboomers, X., & Mano, J. F. (2012). Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8(11). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.040>
- Nicholson, C., & Syková, E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends in Neurosciences*, 21(5). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01261-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01261-2)
- No, H. K., & Meyers, S. P. (1995). Preparation and characterization of chitin and chitosan- a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 4(2). [https://doi.org/10.1300/J030v04n02\\_03](https://doi.org/10.1300/J030v04n02_03)
- Novak, U., & Kaye, A. H. (2000). Extracellular matrix and the brain: Components and function. In *Journal of Clinical Neuroscience* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.1054/jocn.1999.0212>
- Pai, S. a. (2009). Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2009. In *Current Science (00113891)* (Vol. 97, Issue 6).
- Pasquale, V., Martinoia, S., & Chiappalone, M. (2010). A self-adapting approach for the detection of bursts and network bursts in neuronal cultures. *Journal of Computational Neuroscience*, 29(1–2). <https://doi.org/10.1007/s10827-009-0175-1>
- Petroff, O. A. C. (2002). GABA and glutamate in the human brain. In *Neuroscientist* (Vol. 8, Issue 6). <https://doi.org/10.1177/1073858402238515>
- Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N., & Watts, P. (2000). Cellular responses to chitosan in vitro: The importance of deacetylation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11(12). <https://doi.org/10.1023/A:1008997311364>
- Prince, E., & Kumacheva, E. (2019). Design and applications of man-made biomimetic fibrillar hydrogels. In *Nature Reviews Materials* (Vol. 4, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0077-9>

- Quartz, S. R., & Sejnowski, T. J. (1997). The neural basis of cognitive development: A constructivist manifesto. In *Behavioral and Brain Sciences* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.1017/S0140525X97001581>
- Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., & Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *19*(12). <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1134>
- Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
- Roth, F. C., & Draguhn, A. (2012). GABA metabolism and transport: Effects on synaptic efficacy. In *Neural Plasticity* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/805830>
- Schneidman, E., Freedman, B., & Segev, I. (1998). Ion Channel Stochasticity May Be Critical in Determining the Reliability and Precision of Spike Timing. *Neural Computation*, *10*(7). <https://doi.org/10.1162/089976698300017089>
- Shepherd, G. M. (2004). The Synaptic Organization of the Brain. In *The Synaptic Organization of the Brain*. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195159561.001.1>
- Steriade, M., Amzica, F., & Nunez, A. (1993). Cholinergic and noradrenergic modulation of the slow ( $\approx 0.3$  Hz) oscillation in neocortical cells. *Journal of Neurophysiology*, *70*(4). <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.4.1385>
- Tang, X., Zhou, L., Wagner, A. M., Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Gage, F. H., & Chen, G. (2013). Astroglial cells regulate the developmental timeline of human neurons differentiated from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, *11*(2). <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.05.002>
- Tibbitt, M. W., & Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. In *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 103, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/bit.22361>

- Tukker, A. M., de Groot, M. W. G. D. M., Wijnolts, F. M. J., Kasteel, E. E. J., Hondebrink, L., & Westerink, R. H. S. (2016). Research article is the time right for in vitro neurotoxicity testing using human iPSC-derived neurons? *Altex*, 33(3). <https://doi.org/10.14573/altex.1510091>
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of astroglia. *Physiological Reviews*, 98(1). <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Victor, R. de S., Santos, A. M. da C., de Sousa, B. V., Neves, G. de A., Santana, L. N. de L., & Menezes, R. R. (2020). A review on Chitosan's uses as biomaterial: Tissue engineering, drug delivery systems and cancer treatment. In *Materials* (Vol. 13, Issue 21). <https://doi.org/10.3390/ma13214995>
- Wagenaar, D. A., Pine, J., & Potter, S. M. (2006). An extremely rich repertoire of bursting patterns during the development of cortical cultures. *BMC Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-11>
- Wagenaar, D., Demarse, T. B., & Potter, S. M. (2005). MeaBench: A toolset for multi-electrode data acquisition and on-line analysis. *2nd International IEEE EMBS Conference on Neural Engineering, 2005*. <https://doi.org/10.1109/CNE.2005.1419673>
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790). <https://doi.org/10.1126/science.1128134>
- Wolbarsht, M. L. (1964). The Basis of Sensation. The Action of the Sense Organs. E. D. Adrian. *The Quarterly Review of Biology*, 39(4). <https://doi.org/10.1086/404399>