

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA**



**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE**

**Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in  
"Chimica e Tecnologia Farmaceutiche"**

Tesi di Laurea

**"Progettazione e validazione di un modello sperimentale per lo studio del  
modellamento sinaptico"**

**Relatrice:**

Prof.ssa Anna Maria Pittaluga

**Candidato:**

Matteo Ascia Mostosi

Anno accademico 2023-2024

INDICE:

Sommario

ACRONIMI.....	4	
<b>1</b>	<b>Introduzione al sistema immunitario .....</b>	<b>5</b>
	<b>1.2 Immunità innata e adattativa .....</b>	<b>5</b>
	<b>1.3 Il sistema del complemento .....</b>	<b>8</b>
	<b>1.3.1 Cosa è.....</b>	<b>8</b>
	<b>1.3.2 Quali sono i componenti.....</b>	<b>8</b>
	<b>1.3.3 Vie di Attivazione .....</b>	<b>10</b>
	<b>1.3.4 Attività Antimicrobica .....</b>	<b>11</b>
	<b>1.3.5 Produzione endogena:.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Introduzione al sistema nervoso centrale.....</b>	<b>13</b>
	<b>2.1 Il sistema nervoso centrale.....</b>	<b>13</b>
	<b>2.2 Componenti cellulari.....</b>	<b>14</b>
	<b>2.2.1 I neuroni.....</b>	<b>14</b>
	<b>2.2.2 La microglia e gli astrociti.....</b>	<b>15</b>
	<b>2.1.3 Gli Oligodendrociti.....</b>	<b>16</b>
	<b>2.3 Le cellule di derivazione mieloide nel sistema nervoso e stati della microglia .....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Il sistema immunitario e il Sistema Nervoso Centrale.....</b>	<b>20</b>
	<b>3.1 Sintesi proteine del complemento nel sistema nervoso centrale.....</b>	<b>21</b>
	<b>3.2 Pruning neuronale e complemento.....</b>	<b>21</b>
	<b>3.3 Scopo della ricerca.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Materiali e metodi .....</b>	<b>27</b>
	<b>4.1. Animali.....</b>	<b>27</b>
	<b>4.2. Trattamento con LPS .....</b>	<b>27</b>
	<b>4.3. Test di preferenza al saccarosio .....</b>	<b>28</b>
	<b>4.4. Preparazione di sinaptosomi corticali.....</b>	<b>28</b>
	<b>4.5. Marcatura dei sinaptosomi con il pHrodo .....</b>	<b>29</b>
	<b>4.6. Western blot .....</b>	<b>29</b>
	<b>4.7. Colture cellulari .....</b>	<b>30</b>

4.8. Microscopia confocale .....	31
4.9. Estrazione di RNA e analisi RT-qPCR .....	31
4.10. Dati e analisi statistica.....	32
<b>5 Risultati e discussione .....</b>	<b>33</b>
5.1. L'animale trattato acutamente con LPS sviluppa segni di infiammazione centrale e cambiamenti comportamentali. ....	33
5.2. Il trattamento acuto con LPS aumenta i livelli di citochine pro- infiammatorie, a livello corticale, spinale e ippocampale di topo. ....	34
5.3. L'animale trattato acutamente con LPS sviluppa segni di alterazioni sinaptiche centrali a livello corticale, caratterizzati da astrocitosi e microgliosi.	37
5.1 La capacità endocitica di cellule microgliali attivate in coltura è aumentata nei confronti di sinaptosomi corticali isolati da animali LPS.....	39
5.5 . Le componenti C1q e C3 del complemento sono significativamente più espresse in corteccia di topo LPS rispetto al topo sano.....	44
<b>6.0 Conclusione:.....</b>	<b>47</b>
<b>7.0 Bibliografia .....</b>	<b>49</b>

## ACRONIMI

sistema immunitario (**SI**)

sistema nervoso centrale (**SNC**)

complesso di attacco alla membrana (**MAC**)

Lipopolisaccaride (**LPS**)

Sclerosi Multipla (**SM**)

Sclerosi Laterale Amiotrofica (**SLA**)

Alzheimer (**AD**)

Polivinilidenfluoruro (**PVDF**)

# 1 Introduzione al sistema immunitario

**1.1. Il sistema immunitario** (SI) è un complesso sistema biologico di cellule e molecole che collaborano per proteggere l'organismo dagli agenti patogeni, come virus, batteri, funghi e altri organismi potenzialmente dannosi e da proteine e macromolecole da loro rilasciate. La sua funzione primaria è quella di riconoscere e neutralizzare queste minacce per mantenere l'omeostasi dell'intero organismo.

In termini di elementi il sistema immunitario è composto da diversi tipi di cellule, tra cui linfociti T e B, cellule dendritiche, macrofagi e granulociti, ognuna con funzioni specifiche nel riconoscimento e nella distruzione dei patogeni. Queste cellule interagiscono tra loro attraverso segnali chimici per coordinare una risposta immunitaria efficace. Inoltre, il sistema immunitario comprende anche molecole come le citochine, mediatori della comunicazione, gli anticorpi e il complemento. Queste proteine, prodotte dai linfociti B, macrofagi e altre cellule del SI (non solo) aiutano a identificare e neutralizzare i patogeni che possono avere intrinseche azioni patogenetiche.

## 1.2 Immunità innata e adattativa

Di risposte immunitarie, cioè quei meccanismi di difesa da agenti estranei, ne esistono di due tipi riconducibili al sistema dell'immunità innata e al sistema dell'immunità adattativa.

L'immunità innata è la prima linea di difesa dell'organismo contro le infezioni. È costituita da barriere fisiche, come la pelle e le mucose, e da meccanismi cellulari e molecolari non specifici che rispondono rapidamente all'identificazione di un antigene. Le cellule chiave dell'immunità innata includono i fagociti (come i macrofagi e i neutrofilo), che inglobano e distruggono i patogeni e le cellule dendritiche. Questi svolgono un ruolo importante nella presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario adattativo. Altri componenti dell'immunità innata includono le proteine del sistema del complemento, il lisozima, gli interferoni e le citochine, le quali sommariamente facilitano l'opsonizzazione e la lisi dei patogeni oltre che regolare la risposta infiammatoria.

L'immunità adattativa, o specifica, è caratterizzata dalla sua capacità di riconoscere specificamente gli antigeni e di attivare una risposta mirata contro di essi. Questa forma di immunità è mediata da cellule specializzate chiamate linfociti T e B. I linfociti B

producono anticorpi specifici che possono legare i patogeni e neutralizzarli o marcare antigeni per favorirne l'eliminazione da parte dei fagociti e del sistema del complemento. I linfociti T, d'altra parte, svolgono un ruolo chiave nella distruzione delle cellule infette e nella regolazione della risposta immunitaria. L'immunità adattativa è anche caratterizzata da memoria immunologica, che consente al sistema immunitario di rispondere in modo più rapido ed efficace a un secondo incontro con lo stesso antigene, stesso meccanismo che sottosta', se malfunzionante, ad una serie di patologie autoimmuni, tra le quali l'allergia.

L'immunità innata è un interessante sistema di difesa che si è specializzato in uno dei distretti sempre considerati esclusi dall'azione del sistema immunitario propriamente detto, ovvero il sistema nervoso. La rivoluzione degli ultimi 20 anni è stata la scoperta dell'esistenza di una immunocompetenza autoctona del sistema nervoso, sia periferico che centrale. Fino alla fine del '900 il sistema nervoso centrale era stato considerato un sistema "immuno-privilegiato", cioè un sistema isolato rispetto al sistema immunitario. Il termine autoctono prima utilizzato introduce il concetto che, anche nel SNC, siano presenti e vengano prodotti elementi facenti parte dell'immunità innata, quali le proteine del complemento, accompagnata da una elevata attività fagocitica e pro-infiammatoria ad opera di cellule gliali. La presenza di queste componenti e lo sviluppo centrale di questi meccanismi erano considerati, fino a non molto tempo fa, derivanti unicamente da un aumento della permeabilità della barriera ematoencefalica a favorire una conseguente migrazione aspecifica e corpuscolare nel parenchima cerebrale di elementi caratteristici della circolazione sistemica come proteine del complemento e leucociti.

Qualunque sia la sua funzione, è importante però ricordare che, lo sviluppo in toto del sistema immunitario e delle componenti cellulari ed umorali che lo compongono, avviene durante la vita embrionale e continua a svilupparsi e maturare nel corso dell'infanzia e oltre. Le cellule immunitarie, come i linfociti, si originano nel midollo osseo e in altri organi linfoidi primari, come il timo. Altre invece, si differenziano dal ceppo mieloide progenitore e si stanziano permanentemente in distretti specifici, come le cellule microgliali. Alcune di queste cellule subiscono un processo di differenziazione e addestramento che le prepara a riconoscere e rispondere in modo specifico agli antigeni, le molecole estranee che possono causare una risposta immunitaria. Per quanto riguarda le proteine, come il complemento, queste hanno sede principale di produzione periferica

nel fegato e secondariamente in cellule specifiche come macrofagi, monociti e altre specie cellulari residenti in tessuti, ma possono anche essere prodotte centralmente da cellule con attività immunocompetente come cellule microgliali.

## **1.3 Il sistema del complemento**

### **1.3.1 Cosa è**

Il sistema del complemento è un antico sistema di riconoscimento dei patogeni scoperto alla fine del XIX secolo. È composto da oltre 30 proteine, perlopiù sintetizzate dal fegato, che circolano nel plasma come tali o legate a membrane plasmatiche. La maggior parte delle proteine del complemento esistono in una forma pro-enzimatica e vengono attivate in modo sequenziale a cascata da delle proteasi specifiche.

La prima funzione attribuita al sistema del complemento è stata l'attività antibatterica complementare a quella degli anticorpi, da cui deriva il nome "complemento".

Successivamente però, osservando una attivazione delle proteine del complemento in assenza di attività anticorpale è stata riconosciuta una sua probabile origine e funzione indipendente dalla immunità specifica e più associabile ad una immunità innata, aprendo un enorme capitolo sulla reinterpretazione di questo sistema e il suo ruolo nell'organismo.

### **1.3.2 Quali sono i componenti**

Il sistema del complemento è costituito da un gran numero di proteine plasmatiche distinte che reagiscono tra loro per opsonizzare i patogeni e indurre una serie di risposte infiammatorie che aiutano a combattere l'infezione. Alcune proteine del complemento, definite zimogeni, necessitano di attività proteasica per attivarsi e svolgere la loro funzione .

Nel caso del sistema del complemento, gli zimogeni precursori sono ampiamente distribuiti nei fluidi corporei e nei tessuti senza effetti avversi. Tuttavia, nei siti di infezione, essi vengono attivati localmente da proteasi a secrezione infiammatorio-dipendente innescando così una serie di potenti eventi antibatterici e regolatori dell'infiammazione.

Questi eventi convergono in una cascata attivante: un enzima del complemento attivato dalla scissione del suo precursore zimogeno scinde quindi il suo substrato, un altro zimogeno del complemento, nella sua forma enzimatica attiva. Questo a sua volta scinde e attiva il successivo zimogeno nella via del complemento.

In questo modo, l'attivazione di un piccolo numero di proteine del complemento all'inizio della via è enormemente potenziata da ciascuna reazione enzimatica successiva, risultando nella rapida generazione di una risposta amplificata.

Ovviamente, così come avviene in altri sistemi ad amplificazione a cascata, questo sistema è soggetto ad una fine regolazione a più livelli, al fine di evitare fenomeni patologici derivanti da un'anomala attivazione enzimatica o in caso opposto, da una carenza di proteine del complemento associata a infezioni o stati immunodeficitari.

Queste proteine comprendono circa il 5% delle proteine plasmatiche (3 grammi/litro) e sono ancora oggi in continua scoperta, motivo per cui la classificazione viene data con ordine crescente in base alla cronologia di scoperta. I frammenti che si generano dalla scissione degli zimogeni inattivi sono designati dalla lettera "b", se dimensionalmente grandi e "a", se piccoli (unica eccezione C2).

Ad oggi numerosi sono gli elementi riconosciuti facenti parte di questo sistema, tra cui:

<b>Componente</b>	<b>Funzione</b>	<b>Regolatore</b>
<b>Iniziatori di cascata</b>		
C1q	Parte del complesso C1q, lega IgM e IgG e componenti cellulari (via classica)	C1 Inibitore
Ficoline (1-3)	Legano carboidrati batterici attivando la via lecitinica	
Properidina	Riconosce corpi apoptotici o frammenti di essi	

<b>Prosecutori di cascata ed effettori</b>		
C1r/C1s	Parte del complesso C1q, scindono rispettivamente C1s e C2, C3	C1 inibitore
MASP (1-3)	Intermedi della via lecitinica (ficoline)	C1 inibitore
C2a/C2b	Parte del complesso C3 e C5 convertasi	

C4a/C4b	Anafilotossina (a), parte del complesso C3 e C5 (b), ligandi di CR1	Fattore I
Factor B a/b	Parte del complesso C3 e C5 convertasi	
C3a/C3b	Anafilotossina (a), C3 e C5 convertasi (b), ligandi di CR1, opsonina	C1inibitore, fattore I e H
C5a/C5b	Anafilotossina e parte del metabolismo lipidico (a), Componente del MAC (b)	Carbossipeptidasi a
C6,C7,C8,C9	Componenti del MAC	Vitronectina, Clusterina, Protectina

Come si può notare, i frammenti piccoli, derivanti dalla scissione dei suoi componenti, hanno funzione di anafilotossine, altrimenti, se sono grandi, hanno funzione strutturale e opsonizzante/litica.

### 1.3.3 Vie di Attivazione

Questa cascata può essere promossa da diversi fattori, a seconda della sequenza enzimatica iniziale vengono differenziate in:

- via classica,
- via alternativa
- via delle lectine.

La via classica è promossa dal legame diretto di C1q sulla superficie del patogeno, o più comunemente, con la formazione di un complesso antigene-anticorpo che porta alla formazione del complesso C1 e della sua attività enzimatica;

la via della lectina che si attiva grazie al riconoscimento ad opera delle ficoline di un residuo zuccherino sulla parete batterica;

la via alternativa che invece subisce attivazione diretta ad opera di varie proteasi presenti sulle membrane cellulari batteriche per scissione della proteina del complemento C3.

Queste vie dipendono, per la loro iniziazione, da diverse molecole, ma convergono nell'attivazione di determinate proteine centrali del complemento quali C3 (nei successivi frammenti attivi C3a e C3b) e C5 (C5a e C5b). L'attivazione di C3b e C5b porta alla formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC) oppure l'attivazione di recettori accoppiati a proteine G (C3aR e C5aR), con conseguente reclutamento ed attivazione delle cellule immunitarie. (Charles A Janeway et al., 2001; Sarma & Ward, 2011)

### **1.3.4 Attività Antimicrobica**

Esistono tre modi attraverso i quali il sistema del complemento protegge l'individuo contro l'infezione. Innanzitutto, genera un gran numero di proteine del complemento che si legano covalentemente ai patogeni, opsonizzandoli favorendone l'ingestione, da parte dei fagociti dotati di recettori per il complemento. In secondo luogo, i piccoli frammenti di alcune proteine del complemento agiscono come chemoattrattori per attivare più fagociti nel sito di attivazione del complemento. In terzo luogo, i componenti terminali del complemento (MAC) danneggiano alcuni batteri creando pori nella membrana batterica.

Siccome il complemento è centrale, sia nella difesa da agenti microbiologici sia nel rilevare e rimuovere pericoli potenziali derivanti da cellule dell'ospite (ad esempio, cellule apoptotiche e immunocomplessi), una carenza di complemento può causare malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (Botto, 2001). D'altro canto, un'attivazione anomala del complemento è correlata a varie condizioni infiammatorie altamente prevalenti, tra cui l'artrite reumatoide, alcune patologie cardiovascolari e patologie nervose centrali. (Durie et al., 1994)

### **1.3.5 Produzione endogena:**

Negli ultimi dieci anni, sono stati identificati nuovi sedi di sintesi, attivazione e di funzione del complemento. Le proteine del complemento derivate dal fegato e circolanti nel siero sono fondamentali nella lotta contro i patogeni ematici. Tuttavia, studi risalenti agli anni '80 hanno indicato che molti tipi di cellule possono sintetizzare e secernere vari

componenti del complemento. Difatti, è stata anche dimostrata una produzione delle componenti del complemento nel cervello e nell'occhio (dove sembrerebbe essere correlato a degenerazione maculare senile e ad altre patologie correlate (Wilke & Apte, 2024)), nei reni e nell'intestino. (Dempsey, 2023)

## **2 Introduzione al sistema nervoso centrale**

### **2.1 Il sistema nervoso centrale**

Il SNC è una componente centrale del corpo umano in quanto coordina e integra le funzioni corporee e facilita la comunicazione tra le diverse parti del corpo e l'ambiente esterno. È composto da due strutture principali: il cervello e il midollo spinale. Queste strutture lavorano in sinergia per processare informazioni sensoriali, generare comandi motori, regolare funzioni autonome e supportare le funzioni cognitive e comportamentali.

Per oltre un secolo è stato proposto che il corretto funzionamento delle reti neuronali nel cervello dipendesse dall'efficiente propagazione dei segnali elettrici tra i neuroni. È di quegli anni l'osservazione della struttura morfologica delle sinapsi neuronali, che coinvolge le strutture presinaptiche e postsinaptiche separate dalla fessura sinaptica. Questo concetto della sinapsi non comprendeva la necessità dell'esistenza di altre tipologie cellulari coinvolte nella comunicazione sinaptica, per renderla efficiente.

Circa 20 anni dopo, le conoscenze sono aumentate e si è iniziato a parlare di coinvolgimento funzionale di un altro tipo cellulare all'interno della sinapsi, specificamente degli astrociti, passando dal concetto della sinapsi bipartita a quella "tripartita" (neurone pre/post sinaptico e astrocita) (Lalo et al., 2021).

## **2.2 Componenti cellulari**

I principali componenti cellulari del SNC sono i neuroni ovvero le cellule caratterizzanti l'organo e la sua funzione. A questi si aggiungono le cellule microgliali, gli astrociti e gli oligodendrociti.

Queste ultime si diversificano a seconda della loro funzione e morfologia e sono considerate le cellule supportanti l'attività neuronale.

### **2.2.1 I neuroni**

I neuroni sono le unità fondamentali del sistema nervoso centrale, responsabili della trasmissione e dell'elaborazione delle informazioni. Questi elementi cellulari altamente specializzati permettono di coordinare tutte le attività corporee, dalla percezione sensoriale ai movimenti volontari, fino alle funzioni cognitive più complesse.

Queste attività sono permesse grazie ad una trasmissione dell'informazione codificata sotto forma di segnali elettrici e chimici che, grazie ad una interconnessione fitta e costante, possono amplificarla, ridurla o alterarla in modo contemporaneo alla sua diffusione.

Oltre a trasmettere segnali, i neuroni elaborano e integrano le informazioni, generando risposte adeguate agli stimoli ambientali. Sono infatti cruciali nei processi di memoria e apprendimento, grazie alla plasticità sinaptica. Questa consiste in modifiche strutturali e di conseguenza funzionali, della forza delle connessioni sinaptiche.

Strutturalmente, i neuroni sono complessi e composti da diverse parti specializzate. Il corpo cellulare (soma) contiene il nucleo e la maggior parte degli organelli cellulari, ed è il centro metabolico del neurone, responsabile della sintesi delle proteine e della manutenzione della cellula. I dendriti sono proiezioni ramificate che ricevono segnali da altri neuroni, aumentando la superficie di contatto del neurone e permettendo la ricezione di numerosi input sinaptici. L'assone infine è una lunga proiezione che trasmette i segnali elettrici e chimici dal corpo cellulare alle terminazioni sinaptiche.

Gli assoni possono essere molto lunghi, permettendo la comunicazione a grande distanza all'interno del SNC, e le sinapsi alle estremità assonali, parte focale della comunicazione

neuronale, dove avviene la trasmissione del segnale ad altri neuroni o a cellule effettrici, attraverso la liberazione di neurotrasmettitori nello spazio sinaptico.

Inoltre, gli assoni sono coperti dalla guaina mielinica, formata da cellule gliali (come gli oligodendrociti nel SNC), che aumenta la velocità di conduzione dei segnali elettrici lungo l'assone.

I neuroni sono distribuiti in modo esteso e organizzato all'interno del SNC, occupando specifiche regioni funzionali.

Nella corteccia cerebrale, i neuroni sono organizzati in strati, ciascuno con diversi tipi di neuroni che svolgono ruoli specifici nelle funzioni cognitive, sensoriali e motorie. All'interno del cervello, i neuroni sono raggruppati in nuclei, come il talamo, i gangli della base e l'ipotalamo, ciascuno con funzioni distinte. Nel midollo spinale, i neuroni sono organizzati in corna dorsali e ventrali. Il cervelletto contiene neuroni specializzati (come le cellule di Purkinje) fondamentali per la coordinazione motoria e l'equilibrio. Il sistema limbico, che include strutture come l'ippocampo e l'amigdala, è ricco di neuroni che regolano le emozioni, la memoria e la motivazione.

## **2.2.2 La microglia e gli astrociti**

Le cellule gliali si distribuiscono in tutte le aree cerebrali e costituiscono approssimativamente la metà di tutte le cellule presenti nel SNC dei mammiferi. Queste cellule, inizialmente raggruppate sotto la classificazione di neuroglie, vengono ora suddivise in microglia e macroglia, e a farne parte sono gli astrociti, la microglia, gli oligodendrociti e le cellule precursori degli oligodendrociti.

Gli astrociti, come componente delle sinapsi tripartite, avvolgono i processi neuronali e regolano l'attività elettrica e chimica in risposta ai segnali neuronali. Studi successivi hanno rivelato che, oltre agli astrociti, anche la microglia e le cellule della linea degli oligodendrociti hanno un significativo impatto sulla struttura e sulla funzione sinaptica neuronale e partecipano attivamente alla trasmissione e alla plasticità sinaptica. Questo ha portato ad una evoluzione del concetto della sinapsi che oggi viene proposta come sinapsi quadripartita (con l'aggiunta della microglia).

La microglia può rifinire le sinapsi eliminando spine dendritiche neuronali ridondanti al fine di mantenere connessioni sinaptiche funzionali. Gli oligodendrociti, da parte loro, sono stati recentemente segnalati come probabili formatori di contatti sinaptici funzionali

uni/bidirezionali e regolatori attivi della plasticità sinaptica in condizioni fisiologiche. (Bergles et al., 2000).

Gli astrociti appartengono alla categoria più ampia di cellule gliali nel SNC. Svolgono varie funzioni cerebrali, tra cui il supporto nutrizionale (favorendo il passaggio di nutrienti dai vasi sanguigni ai neuroni e facilitando il metabolismo neuronale), la regolazione del flusso sanguigno cerebrale e la riparazione a seguito di infezioni e lesioni traumatiche. Oltre alla loro regolazione sinaptica classica di trasmettitori gliali (glutammato e ATP principalmente), è oggi riconosciuto che gli astrociti perisinpatici sono responsabili anche della secrezione di molecole di matrice extracellulare, della fagocitosi e del mantenimento dell'omeostasi microambientale presso le sinapsi neuronali, grazie ad un sistema di trasporto neurotrasmettitoriale (in particolare del glutammato, ma non limitato solo ad esso) e ionico. Infatti, in risposta alla stimolazione neuronale, gli astrociti rispondono con un innalzamento della biodisponibilità del calcio intracellulare sia nel soma sia nei processi e della concomitante liberazione di sostanze neuroattive: come adenosina trifosfato (ATP), glutammato e D-serina in grado di regolare le sinapsi limitrofe (Covelo & Araque, 2018; Haydon & Carmignoto, 2006).

La microglia, i macrofagi del cervello, sono sparse nel tessuto cerebrale con una densità di circa  $6 \times 10^6$  cellule per  $\text{mm}^3$  e, quando assumono lo stato di "riposo", sono altamente dinamiche e si stima che scansionino completamente il parenchima cerebrale una volta ogni poche ore. La microglia, così come gli astrociti, è considerata un effettore del sistema nervoso centrale, in grado di produrre citochine e chemochine, nonché di fagocitare materiale indesiderato.

### **2.1.3 Gli Oligodendrociti**

Gli oligodendrociti maturi sono cellule differenziate che formano guaine di mielina (componente lipoproteica della membrana cellulare oligodendrocitica) attorno agli assoni neuronali che permettono la propagazione saltatoria del potenziale d'azione e aumentano notevolmente la velocità di conduzione del segnale, migliorando così la velocità e l'efficienza della comunicazione tra i neuroni. Gli oligodendrociti maturi si trovano principalmente nella sostanza bianca del sistema nervoso centrale, la parte del cervello e

del midollo spinale che contiene principalmente gli assoni e quindi i loro rivestimenti (che determinano il colore biancastro).

Le cellule precursori degli oligodendrociti sono state identificate per la prima volta negli anni '80 e sono il quarto tipo di cellule gliali nel cervello, costituendo il 5%-10% di tutte le cellule neuronali, e hanno funzioni uniche come proliferazione, differenziazione, e auto-rinnovamento, che si stanno ancora ampiamente studiando in quanto sembrerebbero una fonte di cellule staminali attive nel SNC.(Allen & Lyons, 2018)

### **2.3 Le cellule di derivazione mieloidi nel sistema nervoso e stati della microglia**

La migrazione delle cellule mieloidi nel tessuto neuronale è un evento ancestrale già osservabile negli esseri viventi più antichi. È quindi un evento che può essersi sviluppato precocemente nell'evoluzione del sistema nervoso, come suggerito dal fatto che elementi simili alla microglia sono presenti nei gangli degli anellidi (ad esempio, la sanguisuga) e nei molluschi. Nei vertebrati, lo sviluppo del sistema nervoso centrale è associato a un significativo aumento della densità delle microglia nel parenchima (che costituisce circa il 10% della popolazione totale delle cellule cerebrali nei mammiferi). Infatti, durante l'embriogenesi, mentre la maggior parte della popolazione cellulare neuronale si sviluppa a partire dall'ectoderma, la microglia invece deriva dall'infiltrazione corpuscolare di una linea cellulare ematopoietica di monociti che si stanziavano prima della formazione della barriera emato-encefalica.

Dopo essere penetrate nel cervello, le cellule mieloidi subiscono un notevole rimodellamento, che cambia il loro aspetto strutturale e la loro fisiologia. Le cellule microgliali acquisiscono una morfologia specifica (un piccolo corpo cellulare dotato di diversi processi extra-sottili e altamente mobili), assumendo uno stato che è stato definito "resting phase" (M0)

Secondariamente, in seguito a stimolazione ad opera di citochine, molecole patogenetiche o altri segnali come: LPS, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-13 si può osservare il passaggio ad un fenotipo attivato (M1). L'attivazione della microglia è caratterizzata dall'accorciamento delle ramificazioni e dall'assunzione di una morfologia più compatta e ameboide, una forma specializzata per operare all'interno dell'ambiente infiammato. Questa attivazione

non è però “univoca”, poiché è associata a cambiamenti nell'espressione di recettori sulla superficie cellulare, che determinano una variazione della polarizzazione cellulare. Di conseguenza, è capace di rilasciare una varietà di mediatori infiammatori a doppia azione in quanto possono contribuire sia a un ruolo protettivo/riparativo dei tessuti, che a una risposta neurotossica dannosa. Recentemente, è stato evidenziato che l'attivazione delle microglia è un processo più diversificato e dinamico di quanto precedentemente descritto con una estremizzazione o semplificazione con i termini di “stato acceso” o “stato spento”.

Ad oggi, la microglia non viene più discussa come un insieme di cellule caratterizzate dall'assunzione di un'unica forma (stato), ma piuttosto da un sistema cellulare in grado di assumere molteplici forme che co-partecipano all'attività del sistema nel suo complesso. Per semplificare, si è comunque convenuto di generalizzare e riassumere il livello di attivazione ai seguenti tre fenotipi:

- lo stadio “M0” fisiologico,
- il fenotipo attivato “M1” (cui si fa corrispondere lo stadio attivato in modo classico con attività antimicrobica),
- il fenotipo “M2”, attivato in modo alternativo.

Questi stati di attivazione o, meglio detti, di polarizzazione, differiscono negli stimoli attivanti, nell'espressione di marcatori e nei mediatori secreti.

Il fenotipo M1 è associato a risposte pro-infiammatorie, antimicrobiche e neurotossiche, mentre il fenotipo M2 media principalmente funzioni antinfiammatorie e neuroprotettive (Wendimu & Hooks, 2022).

In diverse patologie, la microglia acquista stati funzionali distinti e durante la progressione della malattia le cellule microgliali si modificano e cambiano il loro fenotipo. La microglia attivata interagisce specificamente con i neuroni e influenza la loro sopravvivenza sia in modo positivo che negativo: infatti può entrare in contatto fisico con i neuroni lesionati e rimuovere sinapsi, attraverso un processo chiamato “*synaptic pruning*” (eliminazione sinaptica, Geloso & D'ambrosi, 2021). In alcuni casi, intere ramificazioni dendritiche vengono eliminate, oppure si osserva un massivo rilascio di sostanze come citochine antinfiammatorie, fattori di crescita, ormoni e glucocorticoidi, capaci anche di regolare la formazione e le dimensioni delle specializzazioni neuronali (Wendimu & Hooks, 2022). Come parte del processo di attivazione, inoltre, le cellule

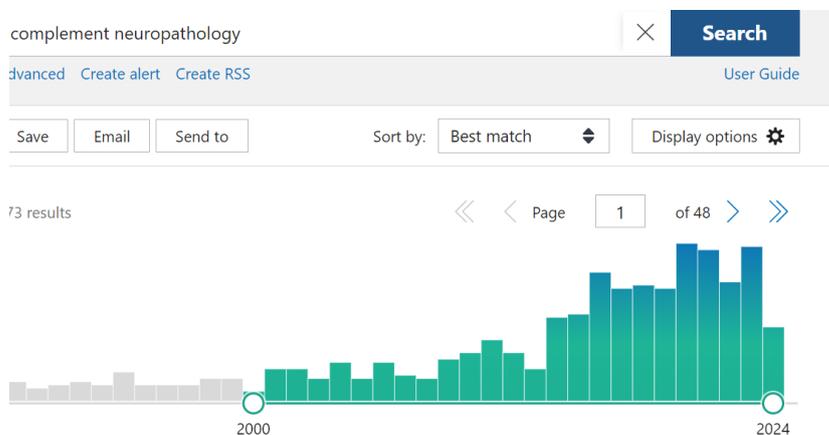
microgliali rilasciano diverse sostanze, incluse specie reattive dell'ossigeno e citochine pro-infiammatorie, che influenzano il processo patologico durante la fase acuta e cronica così come durante la eventuale successiva rigenerazione.

Attraverso questa profonda metamorfosi, la microglia è in grado di adattarsi all'ambiente neuronale e diventare parte integrante del sistema nervoso cooperando alla regolazione dello sviluppo, il rimodellamento e la plasticità del SNC.

### 3 Il sistema immunitario e il Sistema Nervoso Centrale

La scoperta che il SNC non è un sistema immuno-privilegiato, ma che è accessibile o addirittura produce componenti del SI, ha aperto la strada ad una re-interpretazione del ruolo del sistema immunitario nella fisiopatologia dell'individuo. Questo concetto va esteso anche al sistema del complemento, rendendo necessario il superamento della visione classica delle funzioni di questo complesso. Tradizionalmente, il sistema del complemento veniva considerato un agente opsonizzatore, chemiotattico e litico nei confronti di agenti eziologici (es. virus batteri). Ad oggi, il suo ruolo è stato amplificato anche a meccanismi che caratterizzano e sono alla base sia di processi centrali fisiologici, quali la plasticità e la maturazione neuronale, che di processi aberranti. Molti sono gli studi che ipotizzano un suo possibile coinvolgimento, in caso di attivazione impropria ed estesa, in eventi eziopatogenetici centrali correlati sia a patologia autoimmuni che patologie neurodegenerative neuropsichiatriche (Tenner et al., 2018).

In questo contesto, negli ultimi 20 anni la letteratura dedicata al ruolo neuropatologico del complemento si è sviluppata enormemente. (PUBMED: 2 nel 2000; 47 nel 2023)



La ricerca negli ultimi anni si è principalmente focalizzata sul suo coinvolgimento nella morte neuronale (da 8 a 37), nel controllo della trasmissione chimica (da 6 a 28), nella riorganizzazione della rete sinaptica (da 1 a 28), nei meccanismi di eliminazione neuronale (da 0 a 10), e di infiammazione (da 15 a 60).

### **3.1 Sintesi proteine del complemento nel sistema nervoso centrale**

Il fegato è stato a lungo riconosciuto come il sito unico di produzione delle proteine del complemento, sia costitutivamente che in corso di infiammazione. La definizione è cambiata quando, oltre 35 anni fa, è stato dimostrato che il C1q, il componente iniziale della cascata complementare classica, poteva essere sintetizzato anche nelle cellule mieloidi dei tessuti periferici (Bensa et al., 1983).

La sintesi della maggior parte delle proteine del complemento è ora riconosciuta essere distintamente inducibile in diversi tipi di cellule, comprese quelle immunitarie, endoteliali ed epiteliali e anche in neuroni residenti del SNC, negli astrociti, negli oligodendrociti e nella microglia. Inoltre, in alcuni casi, l'espressione del C1q risulta essere sovra-regolata in assenza di una concomitante attivazione delle serino-proteasi associate, i componenti C1r e C1s, (Veerhuis et al., 2011) suggerendo una sua autonomia di produzione e di funzione indipendenti dall'intero complesso C1 nel cervello.

Sebbene il C1q possa essere sintetizzato da alcuni neuroni durante periodi critici dello sviluppo, la proteina C1q aumenta drasticamente nell'invecchiamento cerebrale nei mammiferi (Stephan et al., 2013) e viene sintetizzata principalmente dalla microglia (Fonseca et al., 2017). Pertanto, mentre in molti casi di malattie neurodegenerative, come il lupus e la sclerosi multipla, è stato ipotizzato che la sua presenza nel sistema nervoso centrale fosse dovuta alla permeabilità della barriera ematoencefalica che può essere transitoriamente compromessa che permette l'ingresso del complemento periferico. Tuttavia, è oggi accettato che i componenti del complemento possono essere sintetizzati dalle cellule residenti del cervello e quindi, sono presenti anche in presenza di una barriera ematoencefalica integra.

### **3.2 Pruning neuronale e complemento**

Tra le funzioni esercitate dalla microglia un'azione di particolare interesse è l'attività fagocitica, la quale si manifesta sia come meccanismo di difesa aspecifica nei confronti di patogeni/residui cellulari, sia come meccanismo più sofisticato di eliminazione di cellule descritto con i termini anglosassoni "pruning", o "engulment" o "trogocytosis".

La fagocitosi è un processo complesso che coinvolge il riconoscimento, l'inglobamento e la digestione di materiale/ cellule indesiderato. In generale, per svolgere correttamente ed efficacemente il suo compito, la microglia necessita di segnali di riconoscimento,

inizialmente detti segnali "trovami", che solitamente includono chemochine rilasciate da cellule attivate nello spazio circostante e che innescano i segnali di "mangiami", che controllano l'internalizzazione e la digestione del materiale.

La prima fase di questa endocitosi consiste nella riorganizzazione del citoscheletro per formare le "coppe fagocitiche" cioè delle introflessioni di membrana responsabili dell'inglobamento e dalla degradazione del materiale internalizzato attraverso il sistema di endosomi e lisosomi. Le cellule microgliali, che possono essere viste come dei fagociti specializzati, sono dotate non solo di recettori per rilevare i patogeni o i complessi molecolari associati al danno tissutale aspecifico, ma anche di una serie di recettori necessari ad identificare danni caratteristici di patologie a manifestazione tessuto specifica come nel caso della Alzheimer (Podleśny-Drabiniok et al., 2020). Inoltre, la microglia utilizza anche le sue funzioni immuno-fagocitiche per modellare sinapsi in varie circostanze con un meccanismo, appunto chiamato "pruning sinaptico".

Questo meccanismo volge ad una semplificazione delle reti sinaptiche eccessive o non necessarie, ed è un evento centrale nella promozione e nella maturazione del SNC nelle diverse fasi di sviluppo. L'eliminazione sinaptica di questo tipo avviene anche nel sistema nervoso periferico, dove le cellule di Schwann, il corrispettivo della microglia nella periferia, sono coinvolte nel mantenimento e nel rafforzamento della giunzione neuromuscolare (Barik et al., 2016).

La microglia entra direttamente in contatto e influenza molti elementi sinaptici in modo molto dinamico, e, soprattutto durante le prime settimane dopo la nascita, ingloba elementi pre-sinaptici deboli o asincroni, come è stato dimostrato nel sistema retinogenicolato, nell'ippocampo, nel cervelletto e nella corteccia cerebrale (Wilton et al., 2019). Questo meccanismo fisiologico non è casuale, bensì è regolato da un sofisticato, e ancora non del tutto elucidato, sistema di identificazione delle sinapsi.

Rilevando il rilascio locale di neurotrasmettitori, la microglia è in grado di discriminare tra sinapsi attive e deboli, inglobando solo quelle che mostrano bassa attività (Schafer et al., 2013). L'inglobamento delle sinapsi da parte della microglia varia nei diversi stadi di sviluppo, regioni cerebrali e stati patologici. Le tempistiche nelle quali si sviluppa il pruning delle sinapsi varia a seconda dell'area cerebrale: nella corteccia visiva primaria umana è completato tra il 4° e il 6° anno di vita, mentre nelle aree coinvolte in funzioni cognitive complesse, come la corteccia prefrontale, continua fino alla fine

dell'adolescenza ed in fase di invecchiamento (Prem et al., 2020). Il particolare sistema attraverso cui le sinapsi indesiderate vengono modellate, coinvolge alcune componenti endogene, in grado di attivare il sistema di pruning.

Tra questi elementi, negli anni più recenti, l'attenzione si è focalizzata sul sistema del complemento, le cui componenti sono espresse sia dai neuroni che dalla glia e la cui funzione non è solo proteggere il sistema nervoso dalle infezioni e dall'infiammazione, ma anche identificare le sinapsi non desiderate nel SNC sia durante lo sviluppo post-natale sia in alcune malattie neurodegenerative/neuropsichiatriche (Hammad et al., 2018). Infatti, il suo utilizzo durante lo sviluppo avviene soprattutto nel sistema retinogenicolato e nell'ippocampo.

Entrando più nel dettaglio, le componenti del complemento maggiormente coinvolte sono la proteina C1q e la proteina C3, in grado di segnalare le sinapsi deboli inducendo la loro "fagocitosi" (da parte della microglia) tramite la mediazione del recettore del complemento 3 (C3R).

L'espressione della proteina C1q nello spazio neuronale è normalmente sovra-regolata durante lo sviluppo infantile per identificare le sinapsi indesiderate e mediare un segnale di "mangiami" (Stevens et al., 2007).

Durante lo sviluppo post-natale, la microglia influisce sulle sinapsi attraverso l'attivazione del recettore CX3CR1 da parte della fractalchina (potente immuno-attrattore per linfociti T e fagociti), prodotto dai neuroni. La fractalchina rilasciata recluta la microglia, comportandosi come un segnale misto di "trovami/mangiami" e determinando la rimozione delle connessioni sinaptiche eccessive. A conferma, i topi geneticamente modificati che non esprimono CX3CR1 mostrano un'iper-connettività eccitatoria seguita da una iper-molteplicità sinaptica e una ridotta funzionalità centrale in età adulta. Questo suggerisce che un fallimento nell'eliminazione delle sinapsi, al momento dello sviluppo, impedisce il normale rafforzamento delle sinapsi stesse. (Paolicelli et al., 2011).

Un'altra via è mediata dal recettore TREM2-DAP12 (espresso sulle cellule mieloidi comprese le microgliali nel SNC) e dai suoi ligandi, che è responsabile della promozione della fagocitosi delle proteine sinaptiche durante i periodi di pruning dei circuiti dell'ippocampo. Infatti, i topi Trem2<sup>-/-</sup> mostrano una microglia difettosa, un aumento della densità sinaptica e una connettività compromessa (Filipello et al., 2018).

Purtroppo, la teoria che propone un ruolo delle microglia nell'eliminazione via fagocitosi delle sinapsi si basa interamente su prove indirette.

È stato osservato con la tecnica di microscopia a fluorescenza ed elettronica che solo i bottoni presinaptici vengono digeriti dalla microglia mentre a livello postsinaptico la microglia sembrerebbe favorire il rimodellamento delle spine dendritiche (Weinhard et al., 2018).

Sebbene siano stati riconosciuti diversi sistemi per l'identificazione delle sinapsi deboli, non è ancora chiaro come le sinapsi normali vengano invece risparmiate dalla rimozione. Si ritiene che molecole responsabili della preservazione e del rafforzamento sinaptico in grado di dare segnali di "non mangiarmi" possano proteggere le sinapsi dal danno durante la attivazione gliale. Ad esempio, nel sistema retinogenicolato in via di sviluppo, l'interazione tra CD47, proteina transmembrana presente sulle membrane neuronali, e il suo recettore, SIRP $\alpha$ , localizzato sulla microglia, inibisce la fagocitosi sinaptica, comportandosi così come un segnale di "non mangiarmi" (Lehrman et al., 2018).

Un equilibrio adeguato tra la formazione e l'eliminazione delle sinapsi è quindi chiaramente necessario per preservare l'omeostasi tra le sinapsi eccitatorie e inibitorie. Se questo equilibrio viene infranto, è stato proposto e in parte dimostrato che lo squilibrio può scatenare malattie neuropsichiatriche come la schizofrenia e i disturbi dello spettro autistico (Sellgren et al., 2019).

A questo proposito, oltre alle situazioni in cui il pruning si verifica probabilmente nelle fasi di sviluppo, recenti studi indicano una riattivazione del meccanismo di "engulfment" sinaptico negli adulti, in seguito a diminuzione dell'attività sinaptica che si può verificare durante l'invecchiamento, o a seguito di danni neuronali da patologie neuro/psichiatriche (Sakai, 2020). La perdita di sinapsi, insieme all'attivazione patologica ed incontrollata delle cellule gliali sono indicatori precoci che si riscontrano spesso in biopsie da pazienti con ridotta attività cognitiva, causata da patologie neurodegenerative in fase di progressione.

Indipendentemente dal trigger scatenante, la riattivazione aberrante di una attività fagocitica può causare un ingente perdita sinaptica, con danno poco prevedibile e non localizzato. Questa ipotesi è supportata dai risultati di studi su patologie

neurodegenerative condotti in modelli murini, ma anche da osservazioni in materiale post-mortem di cervello umano.

In particolare, la malattia di Alzheimer (AD) rappresenta una forma di neurodegenerazione in cui il pruning e la neuroinfiammazione esacerbata coinvolgono la microglia. I geni associati ad aumento rischio per AD includono CR1 ed il sistema del complemento C1q-C3. Questo ha portato a ipotizzare che gli oligomeri di A $\beta$  e gli aggregati di tau permettano la riattivazione della cascata del complemento, favorendo il meccanismo patogenetico della sinaptopatia mediata dal pruning (Vanderheyden et al., 2018).

Sebbene meno documentato rispetto a AD, evidenze di un ruolo della microglia nelle disfunzioni sinaptiche precoci, nel pruning sinaptico e nelle alterazioni dei circuiti eccitatori/inibitori sono state trovate anche in altre malattie neurodegenerative, come il Parkinson la SLA e la Sclerosi Multipla (SM). Tutte queste caratteristiche suggeriscono che la iperattivazione microgliale possa contribuire al declino cognitivo associato a questi disturbi.

### 3.3 Scopo della ricerca

Durante l'ultimo anno accademico, per acquisire i crediti necessari al conseguimento del titolo di laurea, ho condotto la tesi sperimentale all'interno del gruppo di ricerca coordinato dalla Professoressa Anna Maria Pittaluga, presso il laboratorio situato nella sede DIFAR di Genova Sturla (Viale Cembrano 4).

Durante questo periodo ho partecipato a uno studio finalizzato allo sviluppo di una tecnica per evidenziare la propensione delle terminazioni nervose a essere endocitate dalle cellule microgliali. L'obiettivo principale di questa ricerca era proporre e validare l'utilizzo dei sinaptosomi come modello tridimensionale idoneo a tale scopo. Infatti, ad oggi, la maggior parte delle ricerche, dedicate a questo argomento, si è basata su tecniche di immunoistochimica, le quali permettono di evidenziare le differenze nel fenomeno della fagocitosi in un tessuto a seconda dello stato fisiopatologico dell'animale di provenienza, al momento del sacrificio. Queste metodiche, sebbene utili, offrono però solo una visualizzazione statica delle variazioni delle terminazioni nervose rimaste, in base al contesto patologico, senza fornire una chiara definizione delle fasi del processo di rimodellamento né dei complessi molecolari coinvolti.

Il metodo da noi proposto, invece, potrebbe permettere di eseguire una caratterizzazione dinamica del meccanismo, evidenziando i fenomeni che favoriscono l'endocitosi delle terminazioni nervose isolate dalle cellule microgliali attivate.

Se validato, questo approccio potrebbe consentire una disamina dettagliata delle diverse fasi dell'evento, permettendo anche di identificare i componenti e i recettori che regolano il processo, per concedere uno studio approfondito del meccanismo di fagocitosi.

I bersagli individuati potrebbero essere cruciali per lo sviluppo di nuovi interventi terapeutici, offrendo così prospettive innovative per il trattamento di patologie legate all'attivazione microgliale.

## 4 Materiali e metodi

### 4.1. Animali

Topi maschi C57BL/6, del peso di 20-25 g, sono stati acquistati da Charles River, Lecco, Italia, e sono stati alloggiati presso lo stabulario per animali del Dipartimento di Farmacia, sezione di Farmacologia e Tossicologia, presso la Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche dell'Università di Genova (autorizzazione n. 484, 8 giugno 2004). Gli animali sono stati sottoposti ad una dieta standard, con cibo e acqua forniti *ad libitum*. I topi sono stati tenuti in condizioni termo-igrometriche costanti: la temperatura è impostata a 22°C e l'umidità relativa al 50%. L'area di stabulazione ha anche un ciclo regolare di 12 ore di luce/buio (luce dalle 7 di mattina alle 19).

Le procedure sperimentali sono in accordo con la legislazione europea (Direttiva 2010/63/EU), con le indicazioni ARRIVE e con l'ottava edizione della "guida per la cura e l'utilizzo di animali da laboratorio". Queste sono state inoltre approvate dall'Organismo per il Benessere Animale dell'Università di Genova e dal Ministero della Salute.

### 4.2. Trattamento con LPS

Il lipopolisaccaride (LPS) è una molecola presente nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi, ed è una potente endotossina nota per la sua capacità di scatenare forti risposte immunitarie negli animali. L'iniezione di una soluzione di LPS attiva nell'animale le vie di segnalazione che portano alla produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- $\alpha$  (fattore di necrosi tumorale-alfa), e IL-1 $\beta$  (interleuchina 1b). Ciò rende l'LPS uno strumento efficace per indurre un'infiammazione acuta.

La soluzione di LPS dev'essere somministrata per via intraperitoneale. Per ridurre lo stress e il dolore negli animali, questi vengono maneggiati nei giorni precedenti, per abituarli alle procedure scientifiche. In particolare, gli animali sono stati sottoposti giornalmente, per 10 giorni prima dell'iniezione vera e propria, a manipolazione da parte di personale formato. Per effettuare l'iniezione, l'animale è stato trattenuto usando la collottola e la coda con il mignolo.

Il trattamento con LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) è stato somministrato per via intraperitoneale nei topi C57BL/6 per indurre una risposta infiammatoria acuta. La soluzione iniettata è composta da LPS (alla dose di 1,25 mg/kg), disciolto in una soluzione fisiologica sterile. Gli animali sono stati divisi in due gruppi: i topi trattati con LPS, e i topi controllo, che hanno ricevuto l'iniezione del veicolo (fisiologica). Dopo 12 ore dal trattamento, i topi sono stati sacrificati per dislocazione cervicale e prontamente decapitati per raccogliere la corteccia.

### **4.3. Test di preferenza al saccarosio**

Il test di preferenza per il saccarosio è un test usato per valutare la sintomatologia dello stato depressivo. I topi LPS e i topi controllo sono stati posti in gabbie dotate di due bottiglie: una bottiglia contenente una soluzione di saccarosio al 2% e una bottiglia contenente acqua, per 12 ore dall'inizio dell'esperimento. L'indice di preferenza è stato calcolato secondo la seguente formula:  $\text{indice di preferenza} = \frac{\text{volume di soluzione di saccarosio consumato}}{\text{volume di soluzione di saccarosio consumato} + \text{volume di acqua consumato}}$ .

### **4.4. Preparazione di sinaptosomi corticali.**

I sinaptosomi sono vescicole chiuse con un diametro di circa 1  $\mu\text{m}$  che originano dalle terminazioni nervose, le quali vengono isolate partendo da tessuto fresco e poi, separate e purificate mediante centrifugazione a gradiente.

Queste particelle contengono tutti gli organelli necessari per la sintesi e l'immagazzinamento di energia e dei neurotrasmettitori, permettendo così il mantenimento delle caratteristiche funzionali e strutturali delle terminazioni nervose da cui derivano (Breukel et al., 1997).

I sinaptosomi purificati sono stati preparati omogeneizzando il tessuto corticale in una soluzione di saccarosio 0,32 M, tamponato a pH 7,4 con Tris-(idrossimetil)-ammino metano (TRIS, concentrazione finale 0,01 M). L'omogenato è stato centrifugato a 4°C a  $1.000 \times g$  per 5 minuti per rimuovere i nuclei e i detriti cellulari, e il surnatante risultante è stato delicatamente stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll® (6%, 10% e 20% v/v in saccarosio tamponato con Tris) e poi centrifugato a  $33.500 \times g$  per

5 minuti. La frazione sinaptosomiale (lo strato tra il 10% e il 20% di Percoll<sup>®</sup>) è stata successivamente raccolta e lavata mediante centrifugazione con una soluzione fisiologica avente la seguente composizione: NaCl, 140 mM; KCl, 3 mM; MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM; HEPES, 10 mM; glucosio, 10 mM; pH 7,2–7,4).

#### **4.5. Marcatura dei sinaptosomi con il pHrodo**

Il colorante pHrodo Red è un colorante fluorescente sensibile al pH, progettato per migliorare il rilevamento e lo studio della fagocitosi e dell'endocitosi. Questo colorante ha la capacità di rimanere non-fluorescente quando localizzato all'esterno delle cellule, e fluorescente quando si trova nell'ambiente citosolico acido, permettendo l'ottenimento di migliori immagini ed eliminando eventuali artefatti. Una volta all'interno dell'ambiente acido dei fagosomi, il pHrodo Red diventa fluorescente, consentendo una rilevazione accurata della fagocitosi. Grazie alle sue proprietà, abbiamo scelto questo colorante, per rilevare la presenza di sinaptosomi all'interno delle cellule microgliali, al microscopio confocale. I sinaptosomi sono stati marcati con pHrodo come segue: sono stati prima risospesi in 200 µL di soluzione fisiologica con la seguente composizione (mM): NaCl, 140; KCl, 3; MgSO<sub>4</sub>, 1,2; CaCl<sub>2</sub>, 1,2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; NaHCO<sub>3</sub>, 5; HEPES, 10; glucosio, 10; pH 7,4). Successivamente, sono stati marcati con 10 µL di 0,2 mM pHrodo Red (Invitrogen, #P36600) e incubati a temperatura ambiente, sotto agitazione, per 1 ora, protetti dalla luce.

#### **4.6. Western blot**

Abbiamo applicato la tecnica di analisi di proteine in lisati di sinaptosomi corticali per evidenziare la presenza e le possibili variazioni di densità in queste particelle, di proteine del complemento e/o di marcatori di infiammazione, astrocitosi e microgliosi. I sinaptosomi corticali purificati di topo sono stati lisati in un buffer RIPA (10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadato di sodio e inibitori delle proteasi) e quantificati per il contenuto proteico con il saggio BCA. I campioni sono stati fatti bollire per 5 minuti a 95°C in una soluzione (loading buffer, SDS-PAGE) per permettere il caricamento del campione

nel gel. Le proteine sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide-SDS al 4-20% (sono stati caricati 20 µg di proteine per ogni pozzetto) e poi trasferite su membrana PVDF. Le membrane sono state bloccate per 60 minuti a temperatura ambiente con soluzione salina tamponata con Tris-Tween (t-TBS: 20 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl e 0,05% Tween 20) contenente 5% (p/v) di latte scremato in polvere, e poi incubate con i seguenti anticorpi primari durante la notte, a 4°C: con l'anticorpo monoclonale di topo, anti-C1q (1:50 Abcam Cat# ab71940), con l'anticorpo policlonale di coniglio anti-C3 (1:1000; Abcam Cat# ab200999), con l'anticorpo policlonale di coniglio anti-GAPDH (1:7000; Abcam Cat# ab181602), con l'anticorpo policlonare di topo anti-GFAP (1:5000; Sigma-Aldrich Cat# G3893), e con l'anticorpo policlonale di coniglio anti-CD11b (1:1500, Abcam Cat# ab133357).

Dopo tre lavaggi di 5 minuti in t-TBS, le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con i rispettivi anticorpi secondari coniugati alla perossidasi di rafano (1:5000, A9044 e A9169, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Dopo tre lavaggi di 10 minuti in t-TBS, le bande proteiche sono state evidenziate con un sistema di rilevamento per western blot a chemiluminescenza potenziata (ECL). Le immagini sono state acquisite utilizzando il sistema di cattura immagini Alliance LD6 (Uvitec, Cambridge, UK) e analizzate con il software UVI-1D (Uvitec, Cambridge, UK).

#### **4.7. Colture cellulari**

Le cellule microgliali N9 sono un tipo di linea cellulare microgliale immortalizzata, derivata da microglia murina neonatale. Queste cellule sono comunemente usate nella ricerca come modello per studiare vari aspetti della biologia microgliale, compreso il loro ruolo nel SNC. Questo perché queste cellule hanno la peculiarità di mantenere molte delle caratteristiche fenotipiche delle linee microgliali primarie, come la capacità di rispondere a stimoli chimici infiammatori, di produrre molecole segnale (citochine e chemochine) e di fagocitare detriti cellulari.

Le cellule microgliali murine N9 sono state fornite dal Prof. Tullio Florio (Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche – DIMI, Università degli Studi di Genova) e dal Prof. Antonio Torsello (Dipartimento di medicina e chirurgia, Università di Milano-Bicocca). Queste sono state mantenute in DMEM contenente il

10% di FBS con penicillina (100 IU/mL) e streptomicina (10 mg/mL) a 37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Per attivare le cellule N9 ed indurre un fenotipo pro-infiammatorio, esse sono state trattate con LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 µg/mL per 24 ore.

#### **4.8. Microscopia confocale**

I sinaptosomi corticali sono stati coniugati con il pHrodo, e sono stati incubati con le cellule N9 per un'ora a 37°C (50 µg di proteine sinaptosomiali ogni 100.000 cellule). Le cellule sono state coltivate in un µ-Slide 4 Well (Ibidi, # 80426) per permettere l'osservazione del campione attraverso il fondo del vetrino polimerico, consentendo così l'analisi senza fissare le cellule. Le immagini a fluorescenza (512 × 512 × 8 bit) sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale a scansione laser Leica TCS SP2 a tre canali, equipaggiato con linee di eccitazione a 458, 476, 488, 514, 543 e 633 nm attraverso un obiettivo plan-apocromatico a immersione in olio 63×/1,4 NA. Basandosi sulle proprietà dell'obiettivo, le immagini coprivano un'area di circa 246 × 246 µm<sup>2</sup>. La configurazione di raccolta della luce è stata ottimizzata in base al fluorocromo scelto.

La fluorescenza totale del fotogramma corretta è stata determinata con la seguente equazione: fluorescenza totale del fotogramma corretta = densità integrata - (area del fotogramma selezionato x fluorescenza media delle letture di fondo). Le analisi delle immagini e le quantificazioni sono state effettuate utilizzando il software ImageJ (NIH).

#### **4.9. Estrazione di RNA e analisi RT-qPCR**

L'espressione dell'mRNA di TNF-α e IL-1β è stata misurata tramite RT-qPCR. Dopo aver isolato la cortecchia, questa è stata immediatamente risospesa nel reagente Trizol, per permettere l'estrazione totale dell'RNA. La purezza e la concentrazione totale dell'RNA sono state misurate con lo spettrofotometro Nanodrop (Thermo Fischer, USA) e 1 µg di RNA è stato utilizzato per la trascrizione inversa con il kit i Script cDNA Synthesis (Bio-Rad, USA, Cat# 1708840) seguendo il protocollo del produttore.

iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, USA, Cat#1725120) è stato utilizzato per eseguire la PCR quantitativa in tempo reale con lo strumento IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) secondo il protocollo del produttore, nelle seguenti condizioni: 95 °C per 10 min, 95 °C per 15 s (40 cicli); 60 °C per 60 s (40 cicli). La GAPDH è stata utilizzata come riferimento interno. Sono stati utilizzati i seguenti primer: TNF- $\alpha$  (Left Primer: TCTTCTCATTCTGCTTGTGG; Right Primer: GGTCTGGCCATAGAACTGA), IL-1b (Left Primer: AGTTGACGGACCCCAAAG; Right Primer: TTTGAAGCTGGATGCTTCAT) e GAPDH (Left Primer: ATTGTCAGCAATGCATCCTG; Right Primer: ATGGACTGTTCATGAGCC). Le condizioni della RT-qPCR erano le seguenti: 10 s a 95 °C per 10 s, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C, per 40 cicli. L'espressione dell'mRNA è stata calcolata con il metodo  $\Delta\Delta C_t$ , normalizzando con GAPDH.

#### **4.10. Dati e analisi statistica**

I dati e l'analisi statistica sono conformi alle raccomandazioni sulla progettazione e l'analisi sperimentale in farmacologia (Curtis et al., 2022). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM di n valori indipendenti (n indicato nelle legende delle figure), dove n indica il numero di animali utilizzati in ciascun esperimento. La dimensione del campione è stata fissata ad almeno n = 5 per ogni gruppo e sono stati condotti tre esperimenti indipendenti. Gli animali sono stati assegnati in modo casuale a ciascun gruppo.

Per l'analisi dei dati/statistica e la creazione dei grafici è stato utilizzato il pacchetto software Sigma Plot 15. L'analisi della varianza è stata eseguita mediante ANOVA seguita da test di confronto multiplo, i confronti diretti sono stati eseguiti mediante il test t di Student. I test post hoc sono stati eseguiti solo se il valore F era significativo e se non c'era una significativa variazione nell'omogeneità. I dati sono stati considerati significativi se  $P < 0,05$ .

## 5 Risultati e discussione

### 5.1. L'animale trattato acutamente con LPS sviluppa segni di infiammazione centrale e cambiamenti comportamentali.

Per indurre un'infiammazione acuta a livello centrale è stato utilizzato come modello sperimentale il trattamento acuto in vivo con LPS. Il topo è stato sottoposto ad un'unica iniezione di LPS (1,25 mg/kg), disciolto al momento, in una soluzione salina sterile e somministrato con un'iniezione intraperitoneale. Gli animali sono stati controllati dall'ora dell'iniezione, ogni due ore, fino al sacrificio, per evidenziare sintomi comportamentali coerenti con l'aggravarsi della neuroinfiammazione. È stato controllato l'aspetto del pelo, che normalmente è liscio, ma in questo caso risultava arruffato, a suggerire l'insorgenza e l'aggravarsi di stato di disagio. Concomitantemente è stata valutata l'attività motoria, che, nei topi malati, risultava ridotta o limitata rispetto gli animali sani, che invece si muovevano più liberamente per tutta la gabbia.

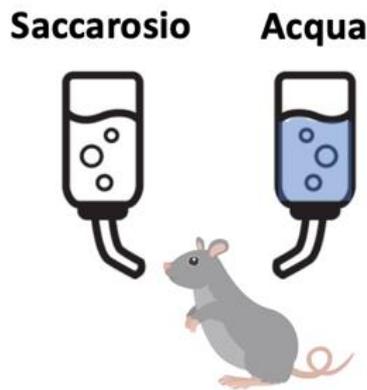
Per analizzare un'eventuale differenza nel comportamento tra i topi LPS e i topi sani, è stato effettuato un test comportamentale chiamato test della preferenza al saccarosio o "*Sucrose preference test*". Questo test viene utilizzato nella ricerca animale per valutare un comportamento di tipo depressivo, caratterizzato da una ridotta capacità di provare piacere. In questo test, agli animali viene dato accesso a due bottiglie: una, contenente una soluzione di saccarosio e l'altra acqua semplice, nel nostro caso per 12 ore. Alla fine del periodo di osservazione, si misura il consumo di ciascun liquido e il rapporto tra i due volumi espresso in %, definito come percentuale di preferenza per il saccarosio. Se l'analisi rivela un'alta preferenza per il saccarosio, il risultato indica che gli animali in quella gabbia mostrano una preferenza per la soluzione dolce e per la ricompensa, comportamento coerente con uno stato fisiologico di benessere. Se invece la preferenza per il saccarosio risulta essere ridotta, se ne deduce l'insorgenza di uno stato di disagio o, meglio, una ridotta capacità di provare piacere, tipico degli animali che sono soggetti a condizioni stressanti o stati infiammatori acuti.

Durante il test di preferenza al saccarosio, è stata osservata una riduzione significativa dell'assunzione di saccarosio negli animali LPS rispetto agli animali controllo. In

particolare, la preferenza degli animali malati era scesa del 30% rispetto agli animali sani.

## FIG. 1

A.



*Fig. 1: Sucrose preference test. (A) Illustrazione che raffigura la condizione del topo durante il test comportamentale, l'animale dispone di due bottiglie esattamente identiche, ma contenenti due diverse soluzioni (acqua e saccarosio oppure acqua semplice).*

### **5.2. Il trattamento acuto con LPS aumenta i livelli di citochine pro-infiammatorie, a livello corticale, spinale e ippocampale di topo.**

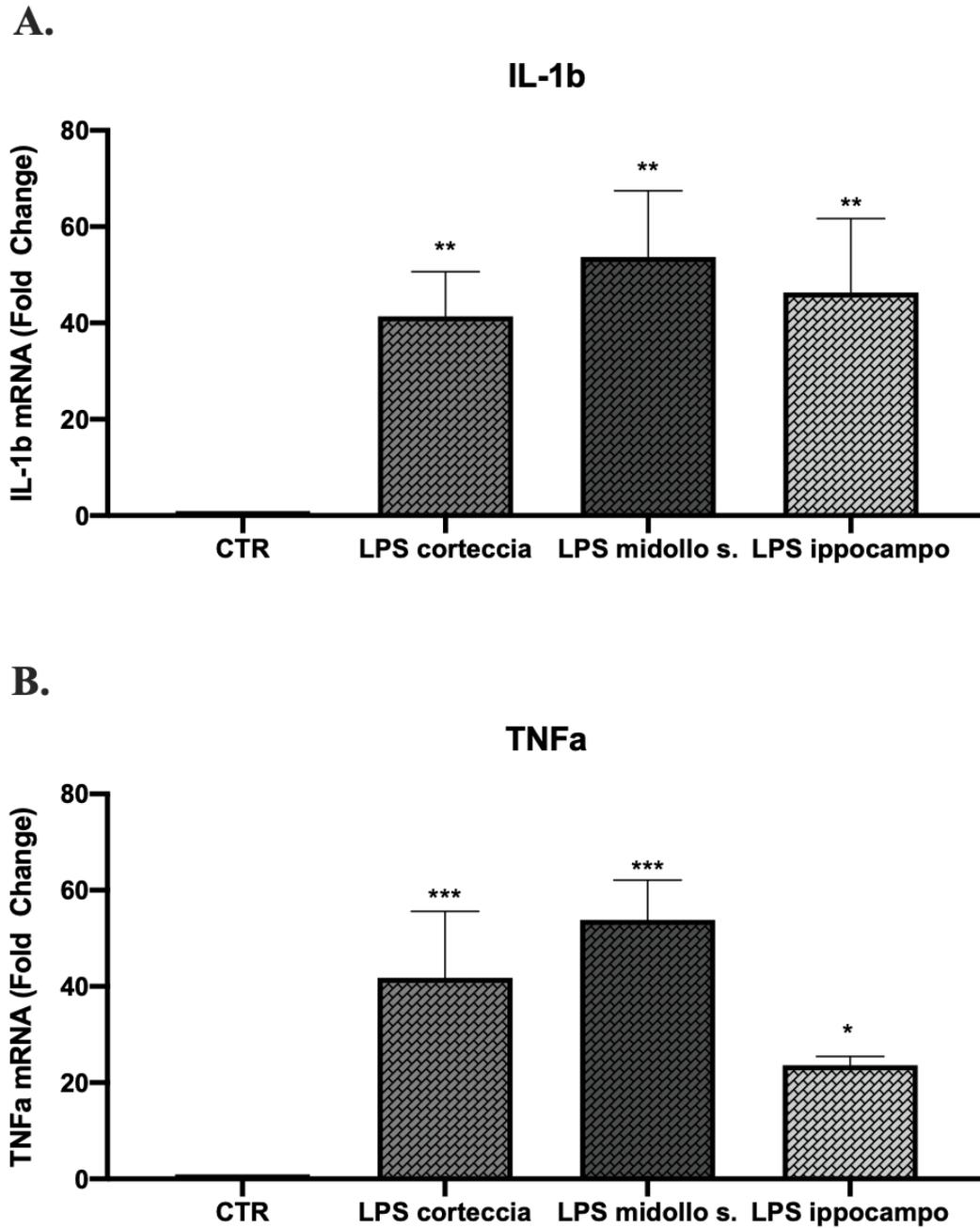
Per verificare che la somministrazione di LPS determini una condizione infiammatoria centrale, abbiamo esaminato 12 ore dopo il trattamento l'espressione di citochine pro-infiammatorie, valutata come espressione dell'mRNA delle citochine TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  in diverse aree cerebrali e cioè in ippocampo, corteccia e midollo spinale. Le due citochine sono utilizzate come biomarcatori per valutare la presenza e la gravità dell'infiammazione nei modelli animali in genere e nel modello LPS in particolare. Infatti, TNF $\alpha$  è una citochina coinvolta nell'infiammazione sistemica in fase acuta. È prodotta principalmente da macrofagi e monociti, e svolge un ruolo cruciale nella regolazione delle cellule immunitarie quando si lega ai suoi recettori, TNFR-1 e 2. TNF $\alpha$  agisce come fattore regolatorio degli adattamenti sinaptici, inducendo morte

cellulare apoptotica e infiammazione. Per quanto riguarda l'IL-1 $\beta$ , essa è un'altra citochina che fa parte della famiglia delle interleuchine e regola le risposte infiammatorie quando viene a contatto con il suo recettore IL-1R. Questa citochina viene prodotta da macrofagi attivati e svolge un ruolo molto importante nel meccanismo di difesa dell'ospite verso gli agenti patogeni, nell'infiammazione a breve termine e nell'immunità.

In questo lavoro è stata effettuata un'analisi qPCR per esaminare la variazione delle citochine pro-infiammatorie nell'animale LPS rispetto all'animale sano, così da assicurare la presenza di un'infiammazione in corso. Il topo è stato sacrificato 12 ore dopo la somministrazione con LPS, e il tessuto cerebrale prelevato (in particolare corteccia, ippocampo e midollo spinale) analizzato per il contenuto dell'mRNA di TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Questa analisi richiede un'attenta esecuzione dell'estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA dal tessuto e un'impostazione precisa della qPCR.

I risultati ottenuti sono riportati in **Figura 2** e dimostrano come il topo trattato con LPS presenti un aumento significativo nell'espressione di TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , rispetto al gruppo controllo. Questi dati *ex vivo* confermano la presenza di un'infiammazione sistemica nell'animale LPS, confermando quanto precedentemente riscontrata nelle osservazioni *in vivo* con gli studi comportamentali dell'animale.

FIG. 2



*Fig. 2: Variazione dell'espressione genica di TNF $\alpha$  e di IL-1 $\beta$  nella corteccia di topo LPS, misurata mediante RT-qPCR. La corteccia, l'ippocampo e il midollo spinale di topo malato e di topo sano sono stati prelevati, analizzati, 12 ore dopo l'iniezione con LPS e quindi omogenizzati per quantificare mRNA delle due citochine. Il grafico è relativo alla variazione genica del TNF $\alpha$  (A) e di IL-1 $\beta$  (B) rispetto al controllo. I*

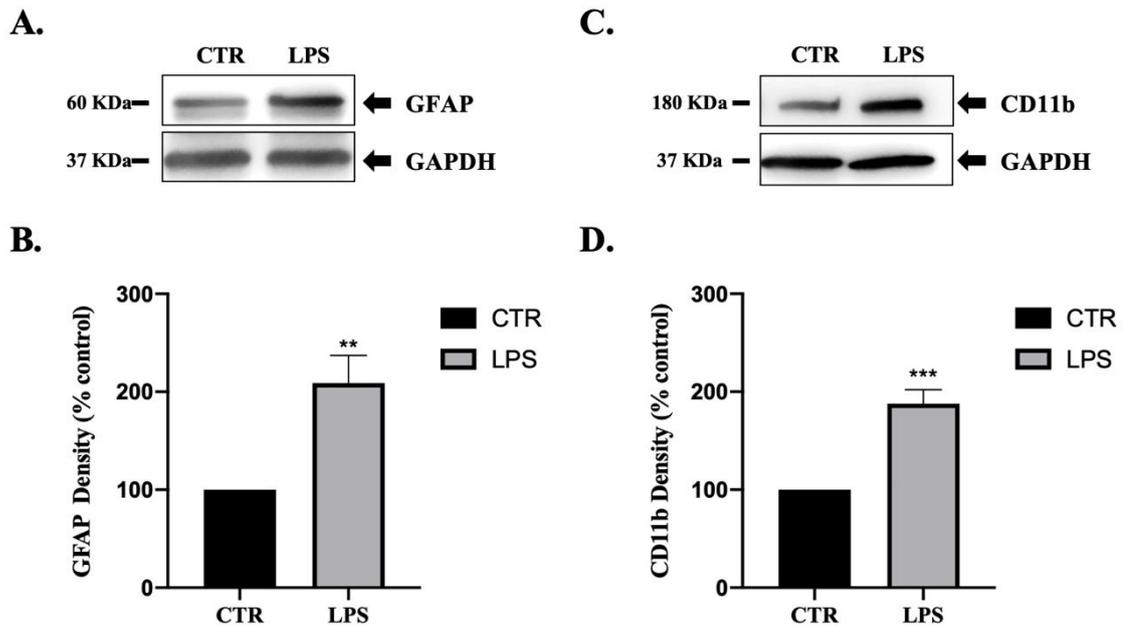
valori rappresentano la media  $\pm$  SEM di  $n = 3$  esperimenti svolti in giorni diversi su animali diversi. Nel grafico il controllo è rappresentativo delle tre aree. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , rispetto ai topi controllo.

### **5.3. L'animale trattato acutamente con LPS sviluppa segni di alterazioni sinaptiche centrali a livello corticale, caratterizzati da astrocitosi e microgliosi.**

Come ulteriore analisi *ex vivo* per determinare e confermare gli effetti pro-infiammatori del trattamento con LPS, è stata analizzata a livello corticale la presenza di due marcatori specifici per definite popolazioni cellulari, di cui un marcatore astrocitario (la proteina gliale acida fibrillare, GFAP) e l'altro microgliale (il recettore Cd11b). La proteina CD11b nel SNC è maggiormente espressa dalle cellule microgliali. Questa proteina, si trova sulla superficie di varie cellule immunitarie, e viene utilizzata come marcatore per identificare e studiare la microglia. GFAP è una proteina a filamento intermedio che si trova specificatamente negli astrociti, e serve da supporto strutturale di queste cellule ma la cui produzione è attivata in risposta agli stimoli infiammatori e /o in corso di lesioni. Nella ricerca, questa proteina è un marcatore ampiamente utilizzato per identificare gli astrociti nel tessuto cerebrale.

Per il nostro scopo, la densità di queste due proteine è stata definita applicando la tecnica del Western blot. Gli esperimenti hanno per prima cosa confermato da un punto di vista qualitativo che l'omogenato di corteccia di topo sano è immuno-positivo per la presenza di queste proteine (**Figura 3, A e C**). Inoltre, abbiamo dimostrato come la corteccia di topo LPS presenti un aumento significativo della densità di CD11b e di GFAP quando confrontata con quella degli animali sani (**Figura 3, B e D**). I dati nel loro complesso confermano la presenza di microgliosi e astrocitosi nella corteccia di animali sottoposti a trattamento con LPS.

**FIG. 3**



*Fig. 3: Effetto dell'attivazione di microglia e astrociti nella corteccia di topo trattato con LPS. La corteccia è stata raccolta e analizzata per la densità della proteina CD11b, un marker della microglia, e della proteina GFAP, un marker degli astrociti. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo interno. (A) Western blot rappresentativo della immuno-positività per GFAP e GAPDH, in topi LPS e topi di controllo. Il blot è rappresentativo dell'analisi di cinque animali per ciascun gruppo sperimentale. (B) Quantificazione della variazione della densità di GFAP nella corteccia dei topi LPS e dei topi di controllo. I risultati sono calcolati come rapporto GFAP/GAPDH nel topo sano e nel topo LPS e sono espressi come percentuale di variazione del topo LPS rispetto allo stesso rapporto in topi di controllo. (C) Western blot rappresentativo delle immuno-positività per CD11b e GAPDH, in lisati di corteccia di topi LPS e di topi di controllo. Il blot è rappresentativo dell'analisi di cinque animali per ciascun gruppo sperimentale. (D) Quantificazione della variazione*

*della densità di CD11b nella corteccia dei topi come prima descritto. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di cinque topi controllo e 5 topi LPS. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , rispetto ai topi controllo.*

## **5.1 La capacità endocitica di cellule microgliali attivate in coltura è aumentata nei confronti di sinaptosomi corticali isolati da animali LPS.**

Per studiare l'efficienza di endocitosi di terminazioni nervose in cellule microgliali attivate, abbiamo messo a punto una tecnica di microscopia confocale che ci ha permesso di analizzare e quantificare la presenza di sinaptosomi all'interno della cellula microgliale.

Il primo passaggio è stato mettere a punto la coltura di cellule microgliali della linea immortalizzata N9. Queste cellule sono state fatte crescere a 37°C in ambiente chiuso in presenza di 5% di CO<sub>2</sub>. Una volta arrivate a confluenza, le cellule sono state piastrate in apposite camere di coltura che ne permettono la visualizzazione con microscopia confocale, senza doverle fissarle al vetrino (vedi per ulteriori informazioni la sezione Materiali e Metodi). Successivamente, le cellule sono state attivate con LPS (1 µg/mL) per 24 ore, per consentire alla microglia di passare da un fenotipo fisiologico ad un fenotipo attivato / infiammato.

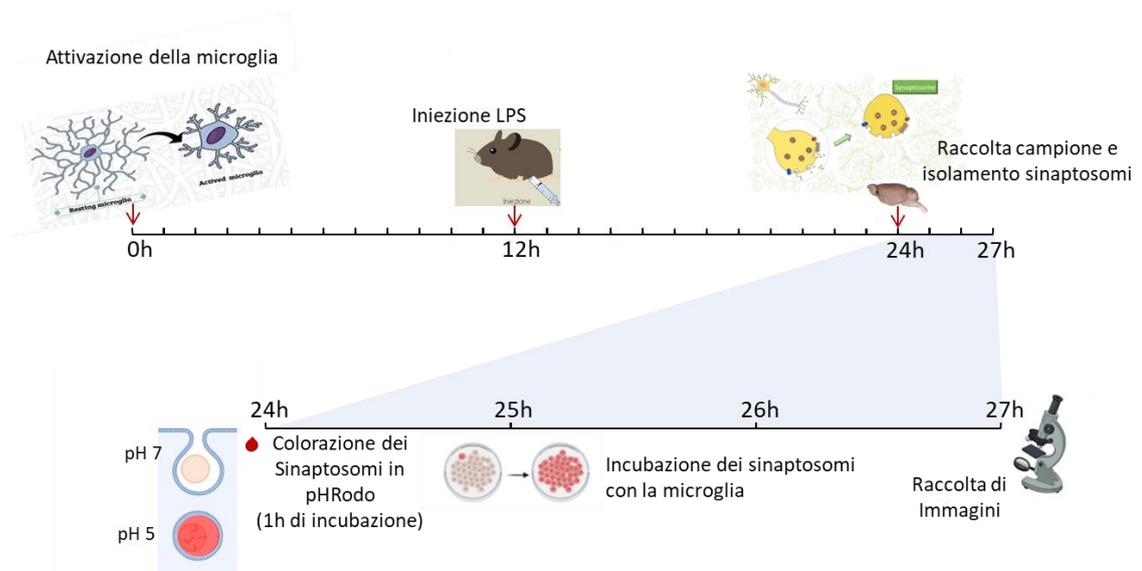
Nel frattempo, abbiamo trattato l'animale con LPS (1,25 mg/kg), con somministrazione intraperitoneale e ne abbiamo valutato le variazioni comportamentali per le successive 12 ore. In questi esperimenti i topi controllo sono animali che hanno subito un'iniezione intraperitoneale, ma di soluzione fisiologica. Allo scadere delle 12 ore l'animale è stato sacrificato per dislocazione, insieme ad un animale controllo e i tessuti di interesse sono stati prontamente prelevati. In questo caso, la corteccia sia di topo controllo che di topo malato, è stata raccolta in saccarosio, per poi proseguire con l'isolamento dei sinaptosomi. Una volta effettuata la separazione dei sinaptosomi, essi sono stati marcati con il colorante pHrodo in incubazione a temperatura ambiente per un'ora, a riparo dalla luce.

Durante l'ora di incubazione, un'aliquota di sinaptosomi è stata analizzata per definire anche se in maniera approssimativa il numero di sinaptosomi che sono stati isolati.

Quando l'incubazione con il pHrodo è terminata, 50 ug di sinaptosomi sono stati aggiunti al pozzetto contenente le cellule microgliali, ed incubati per un'ora a 37°C. Alla fine di questo procedimento, i pozzetti sono stati analizzati al microscopio confocale, a fluorescenza all'interno delle cellule microgliali è stata quantificata. Questa analisi è stata possibile grazie alla preziosa collaborazione con la Prof.ssa Silvia Bruno (Dipartimento di Medicina Sperimentale, DIMES) e con il Prof. Cesare Usai (Istituto di Biofisica, CNR).

La **Figura 4** riporta un'immagine che descrive le diverse fasi dell'esperimento.

**FIG. 4**



**Fig. 4: procedimento sperimentale dell'esperimento di endocitosi dei sinaptosomi nelle cellule microgliali attivate.** A  $t=0$  le cellule microgliali N9 vengono attivate con  $1 \mu\text{g/mL}$  di LPS e, a  $t=12$ , l'animale vien trattato con LPS con una iniezione intraperitoneale. A  $t=24$ , dodici ore dopo il trattamento con LPS; il topo viene sacrificato e viene prelevata la corteccia per l'isolamento dei sinaptosomi, che vengono incubati con il tracciante fluorescente per un'ora. I sinaptosomi marcati (contenenti pHrodo) vengono quindi aggiunti nel pozzetto contenente le cellule

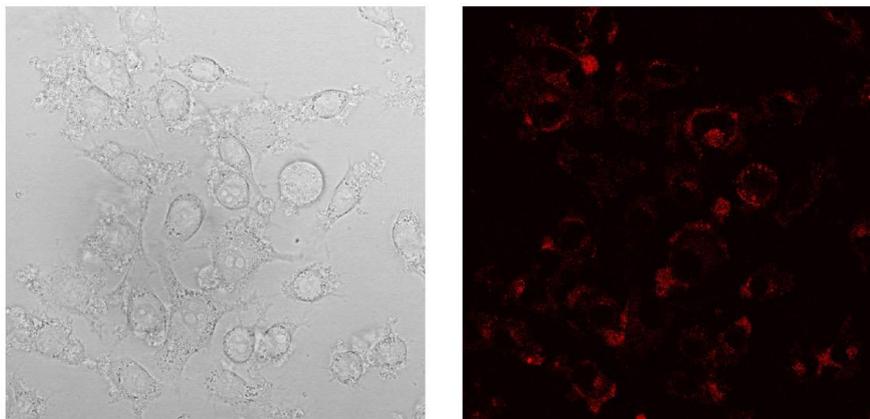
*microgliali attivate. Dopo due ore, le cellule microgliali vengono analizzate al microscopio confocale per il contenuto in fluorescenza.*

I risultati ottenuti dalla microscopia confocale dimostrano che, anche in condizioni fisiologiche, le cellule microgliali sono propense a fagocitare i sinaptosomi. La conclusione si basa sull'osservazione che la fluorescenza del pHrodo è presente e quantificabile anche all'interno delle cellule microgliali incubate con sinaptosomi corticali isolati da topo sano (**Figura 5, A**). È stato però osservato che le cellule microgliali attivate che sono state incubate con i sinaptosomi isolati da topo malato presentano una maggiore fluorescenza interna rispetto alle cellule microgliali incubate con sinaptosomi proveniente da topo sano, a suggerire che lo stato dell'animale possa influenzare l'endocitosi dei sinaptosomi isolati meccanicamente dalla corteccia del topo trattato con LPS. Questo sta ad indicare che le cellule microgliali endocitano con maggiore efficienza i sinaptosomi provenienti da topo LPS rispetto a quelli provenienti da topo sano.

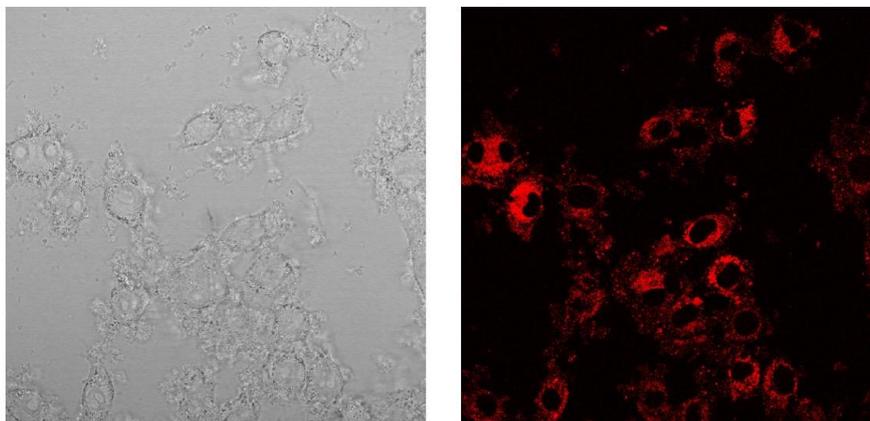
Questo risultato mette le basi per la messa a punto e la caratterizzazione di questo approccio sperimentale per valutare variazioni di “pruning sinaptico” in funzione dello stato fisiopatologico dell'animale.

**FIG. 5**

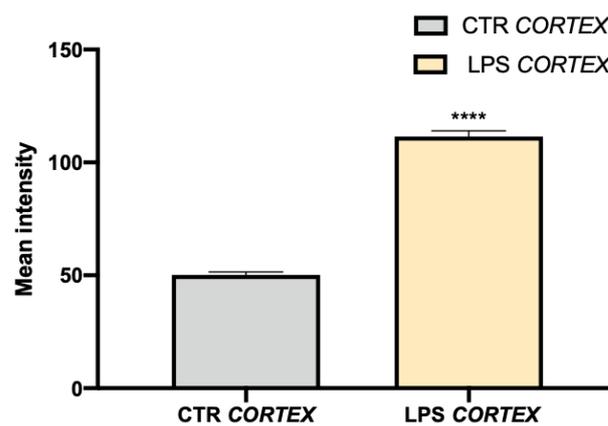
**A.**



**B.**



**C.**



*Fig. 5: La capacità di fagocitosi di sinaptosomi delle cellule microgliali è aumentata quando le terminazioni nervose provengono da animali trattati con LPS. Immagini*

*rappresentative che mostrano l'endocitosi di sinaptosomi marcati con pH-rodo da parte di cellule microgliali N9. I sinaptosomi sono stati isolati da topo sano (A, pannello superiore) o da topo trattato con LPS (B, pannello inferiore). Le immagini sulla sinistra del foglio sono immagini in contrasto per identificare la struttura, la distribuzione e il numero delle cellule microgliali attivate. Le immagini sulla destra indicano l'immunofluorescenza all'interno delle cellule microgliali negli stessi quadranti. I dati sono rappresentativi di 5 analisi indipendenti svolte in giorni diversi con sinaptosomi preparati da n = 5 topi sani e n=5 topi malati. (C ) Intensità media di fluorescenza nelle immagini ottenute negli esperimenti in microscopia confocale. Il grafico mostra la media dell'intensità di fluorescenza, dovuta alla presenza di sinaptosomi da topi sani (CTR) e topi LPS marcati con pH-rodo all'interno di cellule microgliali N9. I dati sono espressi come intensità media e sono riportati come media  $\pm$  SEM dei cinque esperimenti prima citati. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , rispetto ai topi controllo.*

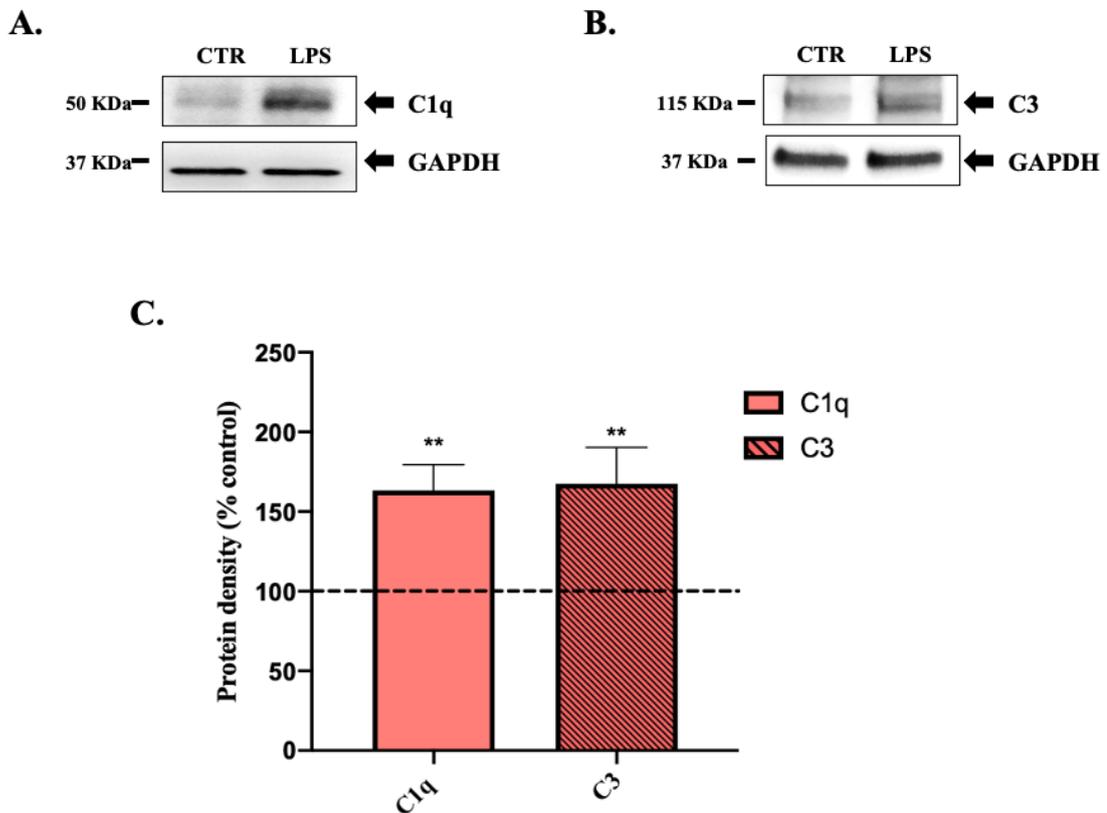
### **5.5. Le componenti C1q e C3 del complemento sono significativamente più espresse in corteccia di topo LPS rispetto al topo sano.**

Come già spiegato nella parte introduttiva, negli ultimi anni è aumentato l'interesse dei ricercatori verso il coinvolgimento del sistema del complemento nella progressione dei disturbi neurodegenerativi e neuro-infiammatori ed in particolare nel fenomeno del "pruning sinaptico". Poiché i precedenti esperimenti hanno dimostrato un aumento di questo evento quando sinaptosomi corticali di topo LPS sono stati aggiunti alla microglia attivata, abbiamo voluto determinare se e in che misura il trattamento acuto con LPS potesse avere determinato delle variazioni significative nell'espressione delle proteine del complemento C1q e C3 nella corteccia di topo LPS rispetto ai sinaptosomi corticali di topo controllo. Ci siamo focalizzati su queste proteine perché sono le componenti del complemento principalmente coinvolte nelle vie classiche e alternative dell'attivazione della cascata del complesso immunitario e sono associate ai meccanismi di rimodellamento delle sinapsi centrali.

Per analizzare l'espressione dei componenti del complemento C1q e C3 abbiamo utilizzato la tecnica del Western blot. I risultati ottenuti hanno dimostrato che nei sinaptosomi corticali di topo LPS è presente un aumento significativo dell'immunopositività di proteine con una massa coerente con quella dei due componenti del complemento (C1q, 25KDa; C3 115KDa), rispetto a quanto presente nel topo sano (**Figura 6 A e B**). La quantificazione dell'immunopositività ha confermato un netto significativo incremento della densità delle due proteine nei sinaptosomi corticali.

Questi risultati permettono di mettere in correlazione l'aumentata endocitosi dei sinaptosomi corticali da parte della microglia attivata con la iper-espressione di queste due componenti del complemento a livello corticale.

**FIG. 6**



*Fig. 6: Cambiamenti nella immuno-positività delle proteine C1q e C3 nei sinaptosomi corticali di topi di controllo e di topi LPS. I sinaptosomi sono stati isolati da corteccia di topo controllo e topo LPS e sono stati analizzati per la densità delle proteine C1q e C3. (A) Western blot rappresentativo dell'immuno-positività per C1q e GAPDH, in topi LPS e topi di controllo. La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo interno. Il blot è rappresentativo dell'analisi di cinque animali per ciascun gruppo sperimentale. (B) Western blot rappresentativo dell'immuno-positività per C3 e GAPDH, in lisati di corteccia di topi LPS e di topi di controllo. Il blot è rappresentativo dell'analisi di cinque animali per ciascun gruppo sperimentale. (C) Quantificazione della variazione della densità di C1q e C3 nella corteccia dei topi LPS e dei topi di controllo. I risultati sono calcolati come rapporto C1q/GAPDH e C3/GAPDH e sono espressi come percentuale del rispettivo rapporto nei topi di*

*controllo-LPS. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di cinque topi. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  rispetto ai topi LPS.*

## 6.0 Conclusione:

Il risultato principale dello studio svolto in questo periodo di lavoro sperimentale è stato mettere a punto una metodologia sperimentale finalizzata alla quantificazione della capacità fagocitica di cellule microgliali nei confronti di terminazioni nervose isolate (sinaptosomi) da definite aree cerebrali di mammiferi.

Successivamente, siamo riusciti ad evidenziare una correlazione tra i) l'induzione di uno stato infiammatorio, ii) l'aumentata espressione di componenti del complemento in terminazioni nervose isolate dalla corteccia di questi topi e iii) l'aumentata capacità fagocitica delle cellule microgliali di queste terminazioni corticali.

Per raggiungere questo obiettivo, siamo partiti dalle conoscenze derivanti dalle altre procedure già utilizzate nel laboratorio, mantenendo quindi tecniche già perfezionate e rientranti nelle pratiche caratteristiche del settore di Farmacologia (BIO/14). Tra queste, ad esempio, il prelevamento del campione dall'animale, limitato all'area cerebrale corticale bilaterale, l'analisi comportamentale dell'animale in fase di infiammazione, l'isolamento di sinaptosomi.

Concomitantemente abbiamo messo a punto o acquisito nuove tecniche quali ad esempio le colture di cellule microgliali, le tecniche di marcatura con pHrodo, l'analisi con tecnica qPCR del mRNA di citochine pro-infiammatorie, l'analisi Western blot di marcatori di astrocitosi e microgliosi nonché di componenti del complemento.

Partendo dall'obiettivo di verificare l'attività fagocitica di cellule microgliali attivate (stimolata con LPS) nei confronti di particelle di origine neuronale, abbiamo posto le basi per ottimizzare una tecnica che, ancorché implementata e migliorata, dovrebbe garantire la ripetibilità della procedura nella valutazione della capacità di "pruning sinaptico" in diverse aree cerebrali e di sua correlazione con la simultanea espressione dei fattori del complemento.

Una volta ottimizzata, questa tecnica potrebbe essere estesa ad altri modelli di infiammazione acuta e a patologie che inducono uno stato di infiammazione centrale, come il modello EAE per la Sclerosi Multipla.

I risultati di questo studio, quindi, non solo puntano a migliorare la nostra comprensione dei processi fagocitici delle cellule microgliali in risposta all'infiammazione, ma hanno la potenzialità di permettere una quantificazione accurata e riproducibile del fenomeno di

rimodellamento sinaptico, ampliando le metodologie utilizzabili in futuri studi di neuropatologie caratterizzate da un fenotipo centrale infiammatorio.

## 7.0 Bibliografia

1. Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6411), 181–185. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT0473>
2. Barik, A., Li, L., Sathyamurthy, A., Xiong, W. C., & Mei, L. (2016). Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *Journal of Neuroscience*, 36(38), 9770–9781. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-16.2016>
3. Bensa, J. C., Reboul, A., & Colomb, M. G. (1983). Biosynthesis in vitro of complement subcomponents C1q, C1s and C1 $\bar{r}$  inhibitor by resting and stimulated human monocytes. *Biochemical Journal*, 216(2), 385–392. <https://doi.org/10.1042/BJ2160385>
4. Bergles, D. E., Roberts, J. D. B., Somogyi, P., & Jahr, C. E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*, 405(6783), 187–191. <https://doi.org/10.1038/35012083>
5. Botto, M. (2001). Links between complement deficiency and apoptosis. *Arthritis Research*, 3(4), 207–210. <https://doi.org/10.1186/AR301/METRICS>
6. Breukel, A. I., Besselsen, E., & Ghijsen, W. E. (1997). Synaptosomes. A model system to study release of multiple classes of neurotransmitters. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 72, 33–47. <https://doi.org/10.1385/0-89603-394-5:33>
7. Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *The complement system and innate immunity*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>
8. Covelo, A., & Araque, A. (2018). Neuronal activity determines distinct gliotransmitter release from a single astrocyte. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.32237>

9. Durie, F. H., Fava, R. A., & Noelle, R. J. (1994). Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *73*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1006/clin.1994.1164>
10. Filipello, F., Morini, R., Corradini, I., Zerbi, V., Canzi, A., Michalski, B., Erreni, M., Markicevic, M., Starvaggi-Cucuzza, C., Otero, K., Piccio, L., Cignarella, F., Perrucci, F., Tamborini, M., Genua, M., Rajendran, L., Menna, E., Vetrano, S., Fahnestock, M., ... Matteoli, M. (2018). The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity*, *48*(5), 979-991.e8. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.04.016>
11. Fonseca, M. I., Chu, S. H., Hernandez, M. X., Fang, M. J., Modarresi, L., Selvan, P., MacGregor, G. R., & Tenner, A. J. (2017). Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0814-9>
12. Geloso, M. C., & D'ambrosi, N. (2021). Microglial Pruning: Relevance for Synaptic Dysfunction in Multiple Sclerosis and Related Experimental Models. *Cells*, *10*(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/CELLS10030686>
13. Hammad, A., Westacott, L., & Zaben, M. (2018). The role of the complement system in traumatic brain injury: a review. *Journal of Neuroinflammation* *2018 15:1*, *15*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12974-018-1066-Z>
14. Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological Reviews*, *86*(3), 1009–1031. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00049.2005>
15. Lalo, U., Koh, W., Lee, C. J., & Pankratov, Y. (2021). The tripartite glutamatergic synapse. *Neuropharmacology*, *199*. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2021.108758>
16. Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Litvina, E. Y., Welsh, C. A., Chang, S. T., Frouin, A., Walker, A. J., Heller, M. D., Umemori, H., Chen, C., & Stevens, B. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron*, *100*(1), 120-134.e6. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2018.09.017>
17. Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., &

- Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1202529>
18. Podleśny-Drabiniok, A., Marcora, E., & Goate, A. M. (2020). Microglial Phagocytosis: A Disease-Associated Process Emerging from Alzheimer's Disease Genetics. *Trends in Neurosciences*, 43(12), 965–979. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2020.10.002>
  19. Prem, S., Millonig, J. H., & DiCicco-Bloom, E. (2020). Dysregulation of Neurite Outgrowth and Cell Migration in Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. *Advances in Neurobiology*, 25, 109–153. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45493-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45493-7_5)
  20. Sakai, J. (2020). How synaptic pruning shapes neural wiring during development and, possibly, in disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), 16096–16099. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2010281117/ASSET/B0DE3665-2DA8-4366-9117-2A563DC9F337/ASSETS/IMAGES/LARGE/PNAS.2010281117FIG02.JPG>
  21. Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/S00441-010-1034-0>
  22. Schafer, D. P., Lehrman, E. K., & Stevens, B. (2013). The “quad-partite” synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, 61(1), 24–36. <https://doi.org/10.1002/GLIA.22389>
  23. Sellgren, C. M., Gracias, J., Watmuff, B., Biag, J. D., Thanos, J. M., Whittredge, P. B., Fu, T., Worringer, K., Brown, H. E., Wang, J., Kaykas, A., Karmacharya, R., Goold, C. P., Sheridan, S. D., & Perlis, R. H. (2019). Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nature Neuroscience* 2019 22:3, 22(3), 374–385. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0334-7>
  24. Stephan, A. H., Madison, D. V., Mateos, J. M., Fraser, D. A., Lovelett, E. A., Coutellier, L., Kim, L., Tsai, H. H., Huang, E. J., Rowitch, D. H., Berns, D. S., Tenner, A. J., Shamloo, M., & Barres, B. A. (2013). A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. *Journal of Neuroscience*, 33(33), 13460–13474. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1333-13.2013>

25. Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W. M., & Barres, B. A. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*, *131*(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.10.036>
26. Tenner, A. J., Stevens, B., & Woodruff, T. M. (2018). New Tricks for an Ancient System: Physiological and Pathological Roles of Complement in the CNS. *Molecular Immunology*, *102*, 3. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2018.06.264>
27. Vanderheyden, W. M., Lim, M. M., Musiek, E. S., Gerstner, J. R., Rajendran, L., & Paolicelli, R. C. (2018). Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *38*(12), 2911–2919. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1136-17.2017>
28. Veerhuis, R., Nielsen, H. M., & Tenner, A. J. (2011). Complement in the brain. *Molecular Immunology*, *48*(14), 1592–1603. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2011.04.003>
29. Weinhard, L., Di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N. L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., Schwab, Y., & Gross, C. T. (2018). Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature Communications* *2018 9:1*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03566-5>
30. Wendimu, M. Y., & Hooks, S. B. (2022). Microglia Phenotypes in Aging and Neurodegenerative Diseases. *Cells*, *11*(13). <https://doi.org/10.3390/CELLS11132091>
31. Wilke, G. A., & Apte, R. S. (2024). Complement regulation in the eye: implications for age-related macular degeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, *134*(9). <https://doi.org/10.1172/JCI178296>
32. Wilton, D. K., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2019). Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annual Review of Neuroscience*, *42*, 107–127. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-NEURO-070918-050306>