



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea  
SCIENZE BIOLOGICHE (L13)

---

**LA PRIVAZIONE DI SONNO PROMUOVE LA  
FAGOCITOSI ASTROCITICA E L'ATTIVAZIONE  
DELLA MICROGLIA NELLA CORTECCIA  
CEREBRALE DEL TOPO**

**SLEEP LOSS PROMOTES ASTROCYTIC  
PHAGOCYTOSIS AND MICROGLIAL ACTIVATION  
IN MOUSE CEREBRAL CORTEX**

Tesi di laurea di:

Ivan Mazzanti

Docente referente  
Chiar.mo Prof:

Rosamaria Fiorini

*Rosamaria Fiorini*

Sessione: Febbraio

A.A: 2019/2020

# La privazione di sonno promuove la fagocitosi astrocitica e l'attivazione della microglia nella corteccia cerebrale del topo

Bellesi M. et al. Sleep loss promotes astrocytes phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex. *J. Of neurosciences*, 37:5263-5273,2017

Recenti evidenze sperimentali hanno mostrato che Merkt e il suo ligando Gas6, geni astrocitari della fagocitosi, sono sovraregolati dopo la privazione acuta di sonno. Inoltre studi su esseri umani e roditori hanno anche rivelato che la perdita di sonno aumenta i marcatori periferici dell'infiammazione, ma non era noto se questi cambiamenti fossero associati a neuroinfiammazione e/o attivazione della microglia, le cellule immunitarie innate residenti nel cervello. In questo studio è stata usata la microscopia a scansione facciale a blocchi seriale per studiare le sinapsi ed i processi astrocitici circostanti nella corteccia frontale del topo dopo 6-8 ore di sonno, dopo veglia spontanea, privazione del sonno (SD) e riduzione cronica del sonno (CSR). La fagocitosi astrocitica, principalmente delle componenti presinaptiche delle grandi sinapsi, è aumentata dopo la privazione sia acuta che cronica del sonno. L'espressione di MERTK e la perossidazione lipidica nei sinaptoneurosomi sono aumentate in maniera analoga dopo la riduzione di sonno acuta e cronica, suggerendo che la fagocitosi astrocitaria possa essere una risposta del cervello all'aumento dell'attività sinaptica associata alla veglia prolungata, per eliminare i componenti usurati delle sinapsi molto utilizzate. Mediante l'uso della microscopia confocale è stato messo in evidenza che i topi CSR ma non SD, mostrano un'attivazione della microglia ed un'aumentata fagocitosi microgliale degli elementi sinaptici senza segni evidenti di neuroinfiammazione nel liquido cerebrospinale. Poiché un basso livello di attivazione prolungata della microglia può causare risposte anormali in seguito ad un secondo stress, questi risultati suggeriscono che la perdita cronica di sonno possa predisporre il cervello ad ulteriori danni.

Sleep loss promotes astrocytes phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex .

In recent experimental studies Merkt and its ligand Gas6, astrocytic genes of phagocytosis, have been observed, to be upregulated in the case of acute sleep loss. A rise in peripheral inflammatory markers levels has also been observed in sleep deprived humans and rodents; however, further studies were needed as it was not clear whether the changes were associated with neuroinflammation and/or activation of microglial cells, innate immune cells located in the brain.

In this study, synapses and surrounding astrocytes processes in the frontal cortex of mice were observed after a 6-8 hours sleep period, after spontaneous wakefulness, after sleep deprivation (SD) and after chronic sleep reduction (CSR) using serial block-face scanning electron microscopy.

An increase of astrocytic phagocytosis was observed after CSR and SD mainly in presynaptic components of large synapses. Besides also MERTK expression and lipidic peroxidation increased in synaptoneuroosomes after CSR and SD, suggesting that astrocytic phagocytosis may be the brain response to a rise of synaptic activity associated with prolonged wakefulness, to remove worn components of heavily used synapses.

Observations by confocal microscopy have shown the activation of microglia and an increment in microglial phagocytosis of synaptic elements in CSR mice, but not in ones with SD. No evident signs of neuroinflammation were observed in the CSF. The results of this study suggest that chronic loss of sleep may lead to a brain predisposition to further damage, as a low-level prolonged microglia activation may cause abnormal responses through a second stress.

# **LA PRIVAZIONE DI SONNO PROMUOVE LA FAGOCITOSI ASTROCITARIA E L'ATTIVAZIONE DELLA MICROGLIA NELLA CORTECCIA CEREBRALE DEL TOPO**

Bellesi M. et al. Sleep loss promotes astrocytes phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex. *J. of Neurosciences*, 37:5263-5273, 2017

# INTRODUZIONE

La maggior parte delle sinapsi eccitatorie della corteccia frontale del topo sono a contatto con i processi astrocitari periferici (PAP).

I PAP si avvicinano alla fessura sinaptica e si espandono dopo una veglia prolungata, probabilmente per la necessità di eliminare gli ioni potassio e il glutammato in eccesso.

Anche l'analisi trascrittomica ha mostrato che l'espressione di circa 1,4% dei geni astrocitari dipende dallo stato sonno-veglia e che è sovraregolata nello stato di veglia rispetto a quello di sonno.

Evidenze sperimentali hanno mostrato che:

- I geni per il recettore MERTK e la proteina gas6 sono sovraregolati nella corteccia in seguito alla privazione del sonno. Il recettore MERTK è coinvolto nella via che attiva la fagocitosi astrocitaria e attraverso l'azione della proteina gas6 lega la fosfatidilserina esposta nelle strutture che devono essere fagocitate.
- nei topi in buona salute l'attività fagocitaria degli astrociti è importante per eliminare i componenti cellulari danneggiati.

La microglia comprende i fagociti della glia nel sistema nervoso centrale e svolgono varie funzioni:

- monitorano il microambiente circostante attraverso i loro prolungamenti
- rilevano l'attività neurale
- eliminano i detriti dei neuroni dopo lesioni o morte cellulare
- contribuiscono al rimodellamento del cervello sano

Cambiamenti dell'omeostasi cerebrale, inclusa l'infiammazione, attivano la microglia.

La privazione del sonno cronica o acuta può portare a processi infiammatori, e quindi si ritiene che la privazione del sonno possa innescare la fagocitosi astrocitaria e l'attivazione della microglia.

Per verificare questa ipotesi, PAPs che circondano le sinapsi corticali del topo sono stati studiati utilizzando SBEM (microscopia elettronica a scansione facciale a blocchi di serie) ed è stata misurata l'AP dopo il sonno normale, la veglia spontanea e la privazione di sonno

Sono stati anche valutati i cambiamenti nei livelli della proteina MERTK e l'entità della perossidazione lipidica, che può derivare da uno stress ossidativo, e a sua volta innescare la fagocitosi

# MATERIALI E METODI

Sono stati usati dei topi transgenici appartenenti ad entrambi i sessi con condizioni e protocolli sperimentali per il sonno, la veglia spontanea e la perdita di sonno acuta e cronica (vedere figura di lato)

- un gruppo è stato lasciato a dormire per 6-8 ore (S)
- un secondo gruppo è stato svegliato periodicamente dal sonno (W)
- un terzo gruppo è stato tenuto sveglio per altre otto ore (SD)
- un quarto gruppo, è stato tenuto sveglio per cinque giorni di seguito (CRS)

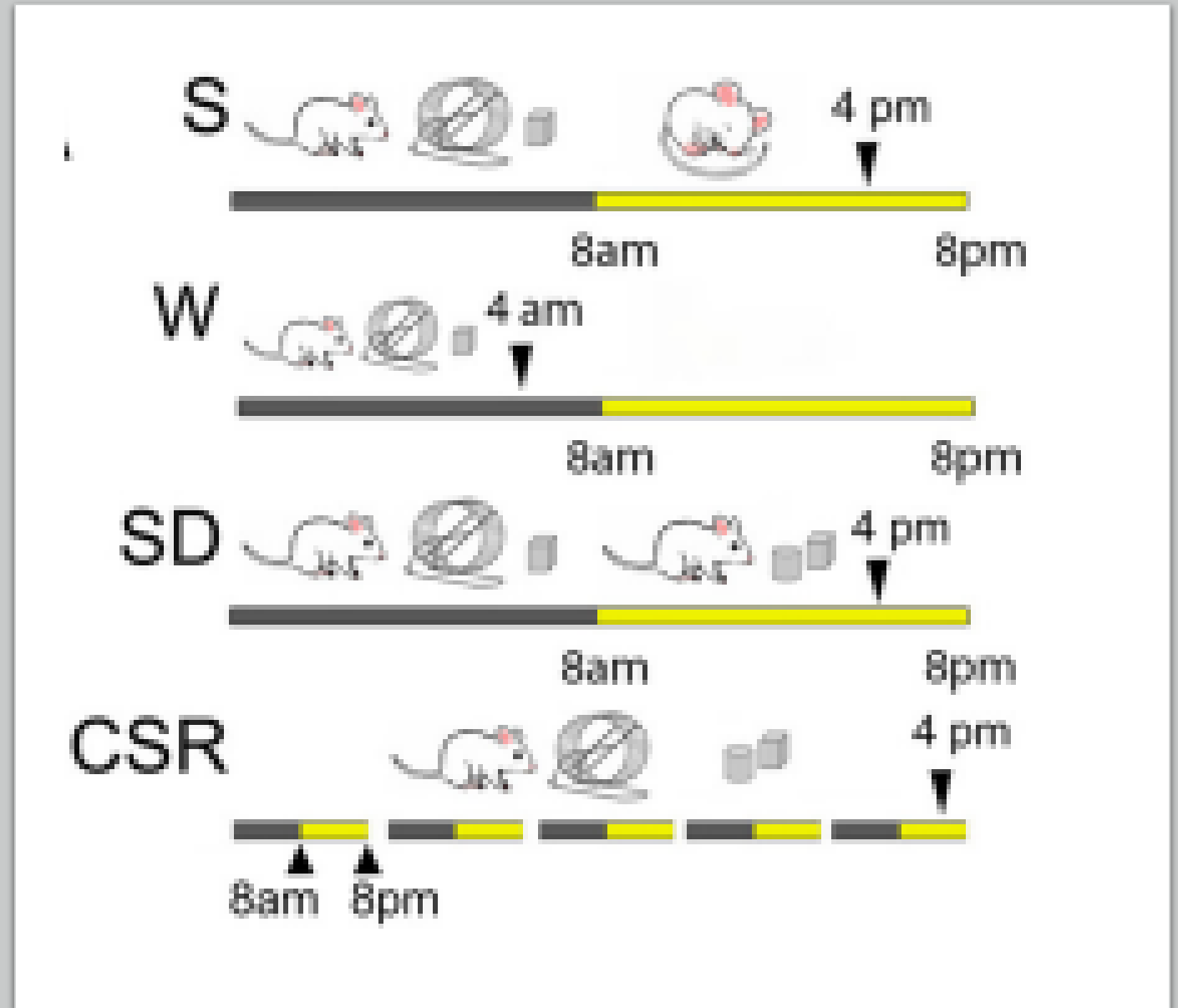
Sono stati effettuati studi ultrastrutturali dell'endocitosi astrocitaria caratterizzando le dinamiche dei processi astrocitari periferici PAPs.

mediante un microscopio elettronico a scansione facciale a blocchi seriale (SBEM) sono state studiate piccole regioni del neuropilo astrocitario

Mediante microarray si è eseguita l'analisi dell'espressione genica nella corteccia cerebrale dei topi e con il western blotting sono state isolate le proteine specifiche per lo studio

sono stati quantificati, la perossidazione lipidica nei sinaptoneuroni corticali ed i fattori infiammatori nel liquido cerebrospinale

l'analisi immunocitochimica è stata effettuata su sezioni coronali dei cervelli mediante la microscopia confocale



# LA PERDITA DI SONNO AUMENTA LA FAGOCITOSI NEGLI ASTROCITARIA

La quantità di neuropilo analizzato è simile in tutte e quattro le condizioni sperimentali (Fig. B).

Le PAPs sono facilmente riconoscibili per le loro strutture morfologiche (Fig.C)

La fagocitosi astrocitaria si è verificata più frequentemente nei topi con riduzione cronica del sonno (CSR) e con privazione del sonno (SD) rispetto a quelli riposati (S). Inoltre l'attività fagocitaria degli astrociti nei topi completamente svegli (W) è paragonabile a quella dei topi riposati (S) ed è differente in maniera significativa a quella dei topi (CSR) ma non significativa a quella dei topi (SD) (Fig. D)

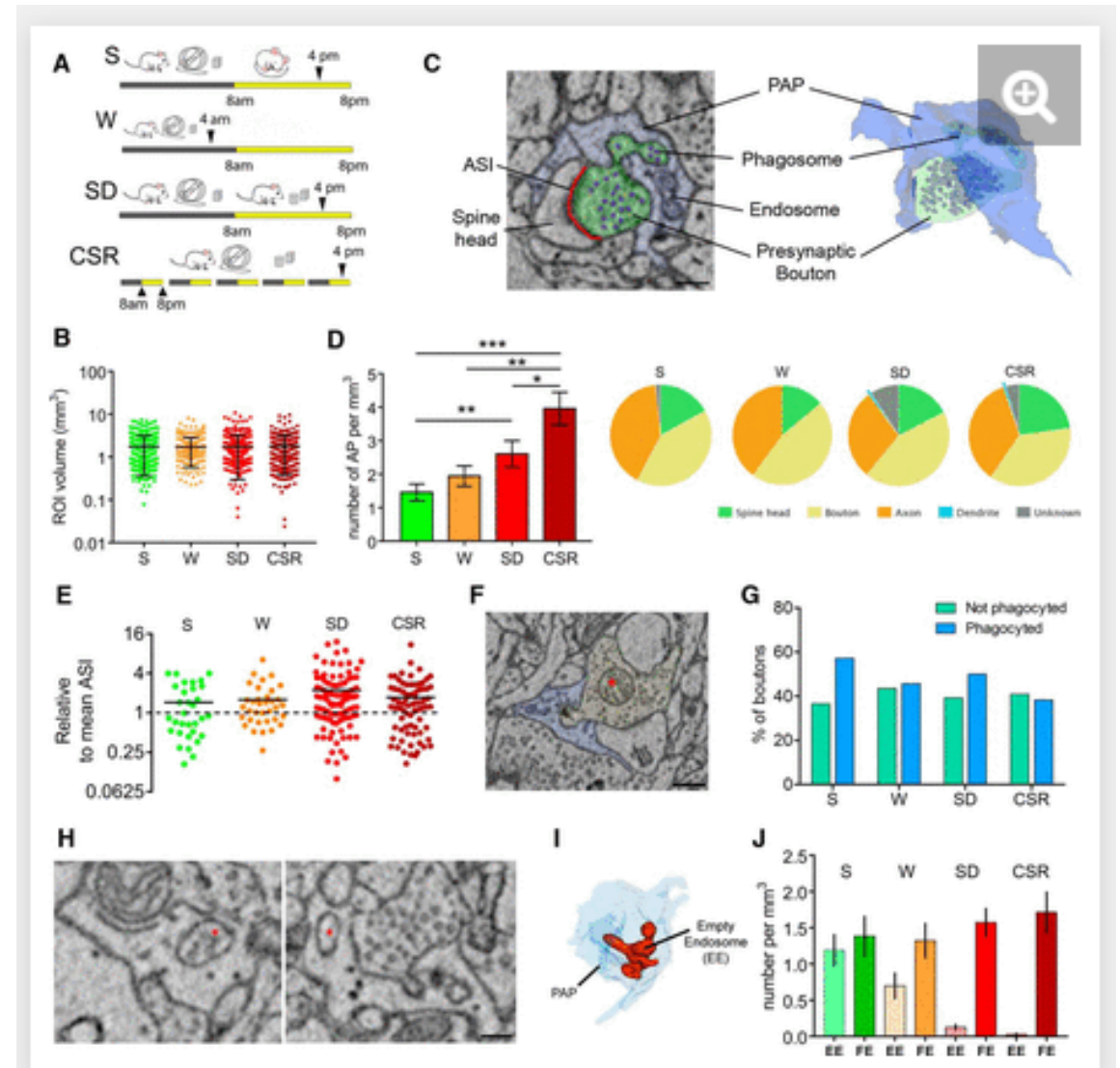
Visualizzazione ultrastrutturale di un bottone presinaptico (giallo) contenente un mitocondrio ed fagocitato da un PAP (in blu). (Fig. F)

Percentuale di bottoni assionali contenenti mitocondri in sinapsi con AP (barre blu) rispetto alle sinapsi senza AP (barre verdi) nei quattro gruppi sperimentali. (Fig.G)

Esempi di endosomi classificati in base alla presenza o meno di materiale (Fig.H)

Ricostruzione 3D di un endosoma senza materiale ma che produce una struttura tubulare complessa all'interno del PAP (Fig.I)

Numero degli endosomi pieni di materiale e vuoti nei gruppi sperimentali. La densità degli endosomi vuoti nei topi W era diversa dei topi S ma anche dai topi SD e CSR (Fig.J)





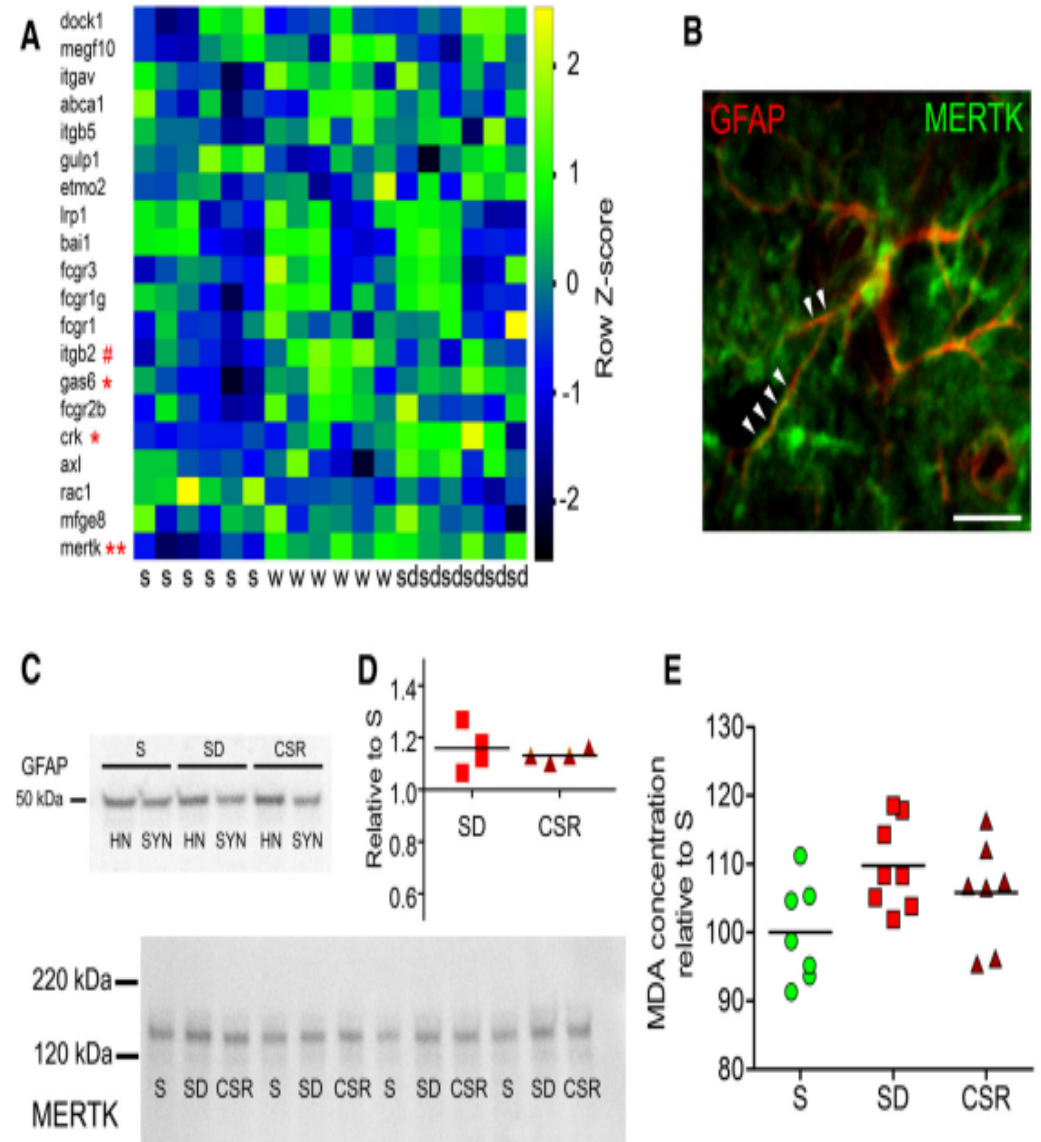
# LA PERDITA DI SONNO AUMENTA L'ESPRESSIONE DI MERTK

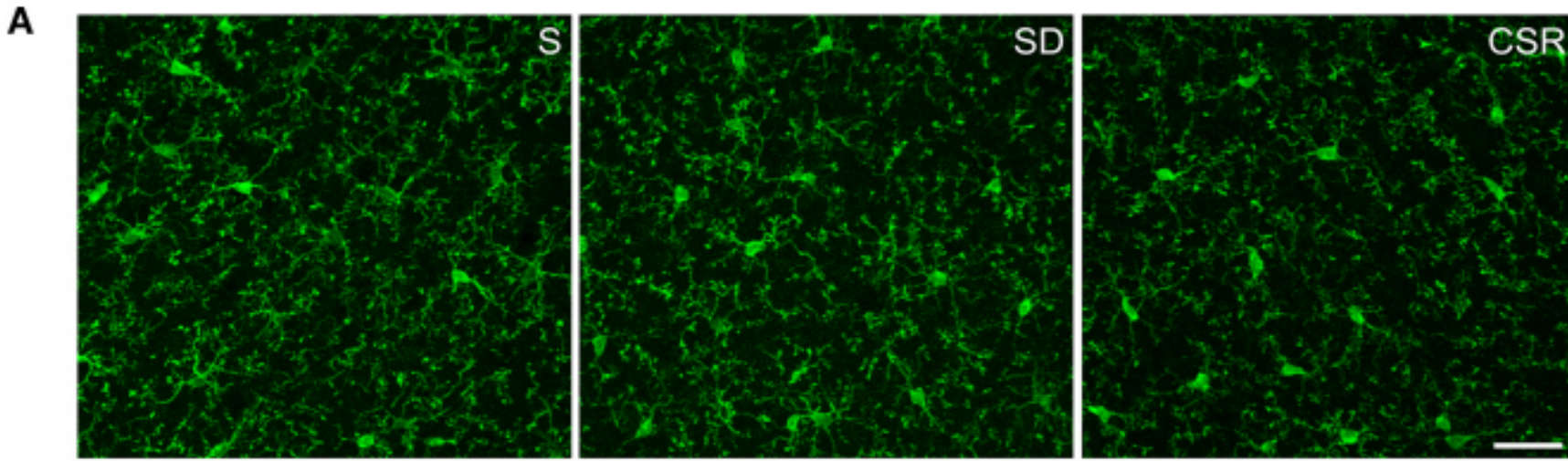
Diagramma termico che mostra i livelli di espressione dei geni astrocitici che indicano attività fagocitaria, precedentemente identificati in un altro lavoro scientifico (Fig.A)

Esempio di una doppia colorazione delle sezioni coronali della corteccia frontale con anticorpi contro MERTK (verde) e contro GFAP (rosso) che è un marcatore per gli astrociti (fig.B)

Quantificazione mediante western blot di MERTK nei gruppi privati del sonno (SD) ed in quelli con una riduzione cronica del sonno (fig.D)

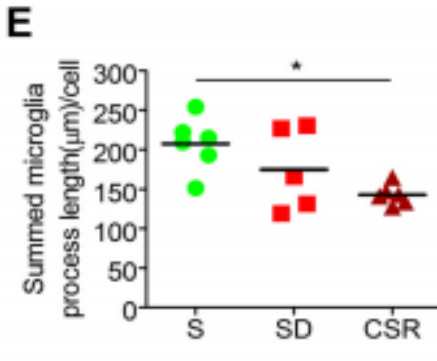
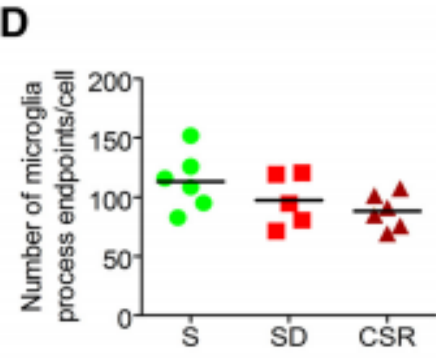
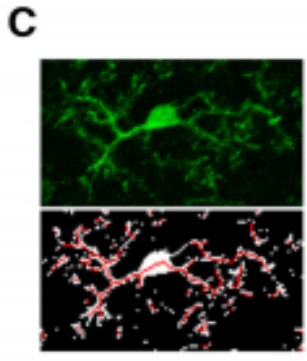
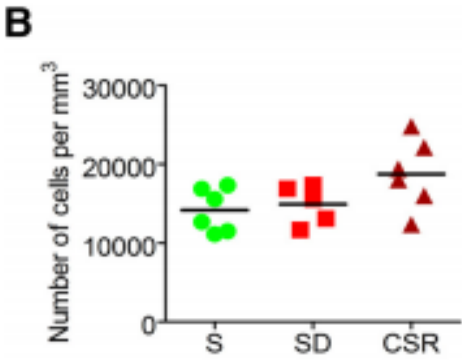
Analisi della perossidazione lipidica che mostra la concentrazione di MDA nei sinaptoneurosomi corticali di topi riposati (S), privati del sonno (SD) e con una riduzione cronica del sonno (fig. E)





**LA PERDITA DEL SONNO È ASSOCIATA AD UNA ATTIVAZIONE DELLA MICROGLIA**

Campioni grezzi di corteccia cerebrale dei topi appartenenti ai gruppi addormentati, con una deprivazione del sonno e con una riduzione cronica del sonno, positivi ad IBA-1 (marker per la microglia e per quantificare la sua densità nella corteccia frontale) (Fig.A). Numero di cellule positive all'IBA-1 per millimetro cubo nei topi dei tre gruppi (Fig.B)

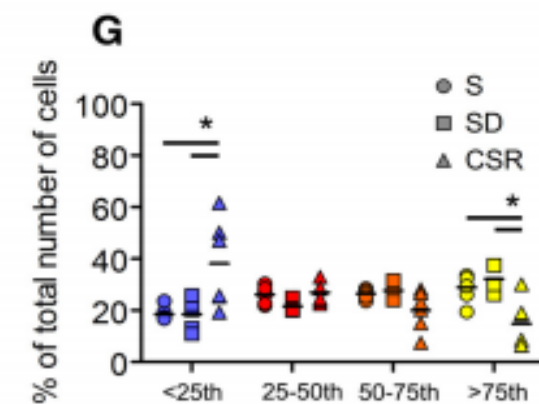
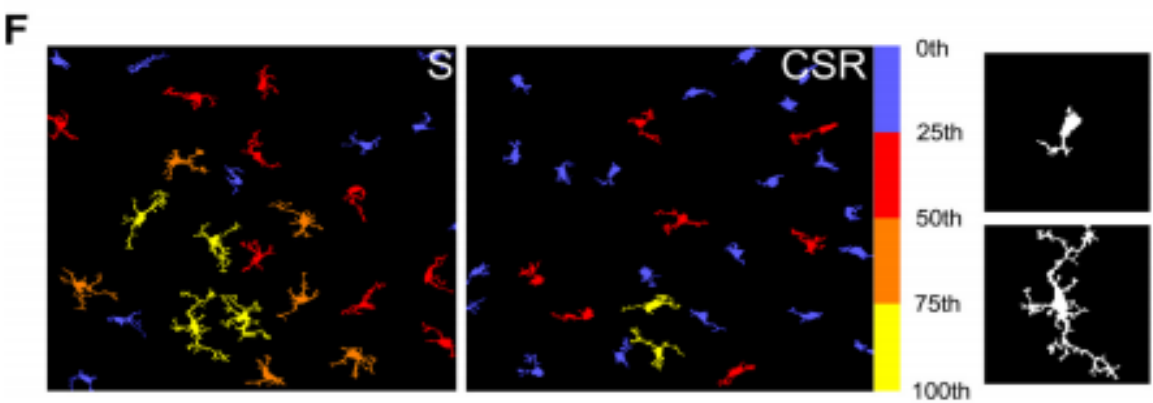


Esempio di una cellula della microglia positiva all'IBA-1, prima e dopo l'elaborazione (Fig.C)

Numero dei processi finali per cellula (Fig. D)

Lunghezza dei processi per cellula nei tre gruppi (Fig.E)

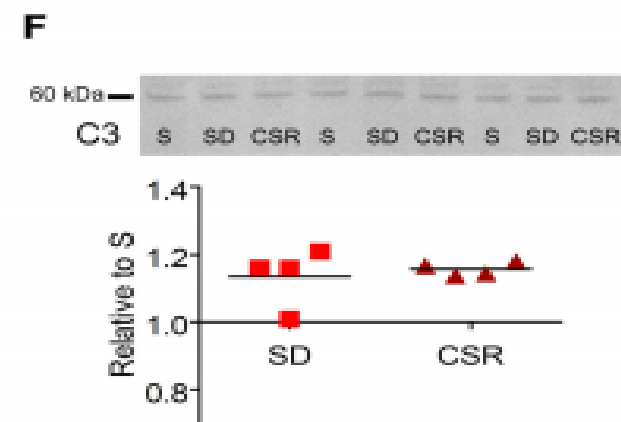
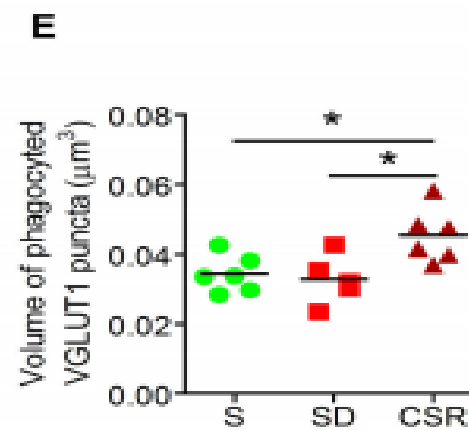
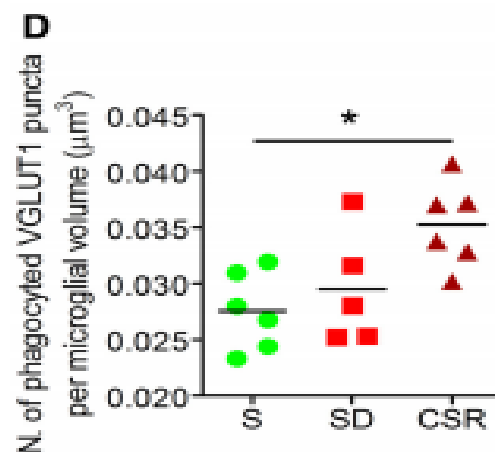
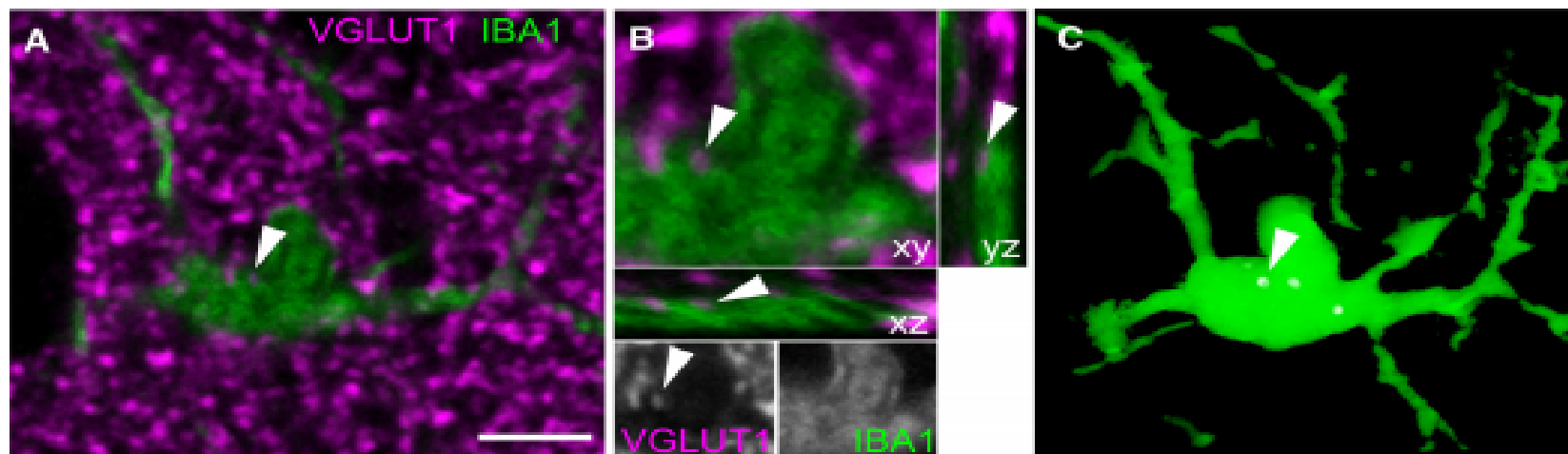
A sinistra, Esempi dei campi S e CSR che mostrano cellule microgliali IBA-1 processate e codificate a colori (gialle più ramificate; blu meno ramificate). A destra, esempi di cellule microgliali IBA-1 scarsamente ramificate (sopra) e più ramificate (sotto)



Distribuzione in quartili del numero di cellule microgliali IBA-1 nei quattro gruppi sperimentali (Fig.G)

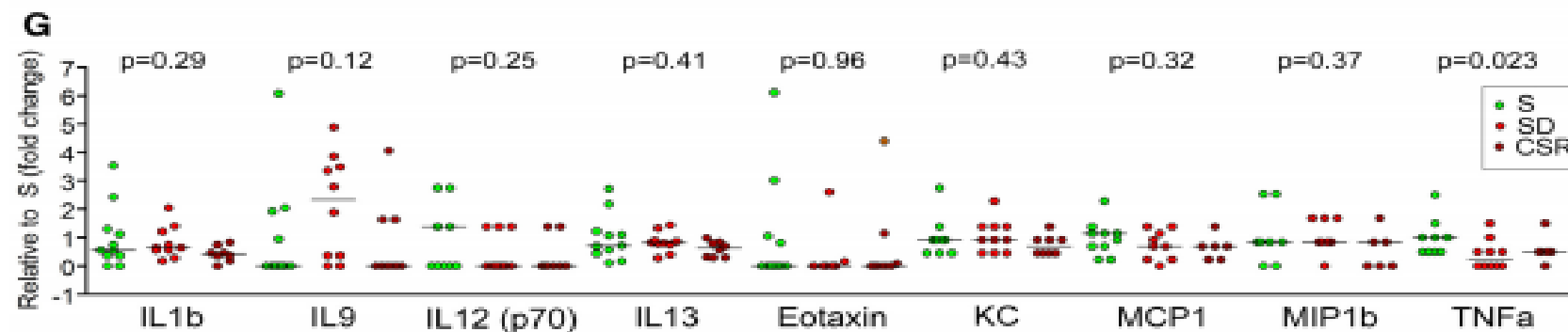
## LA PERDITA DI SONNO CRONICA E' ASSOCIATA AD UNA ATTIVAZIONE DELLA MICROGLIA

Immagine grezza che mostra una microglia positiva per IBA-1 (verde) ed i terminali presinaptici positivi per VGLUT-1 (viola) in un topo con una riduzione cronica del sonno (Fig. A)  
 Ricostruzione 3D della stessa cellula con l'elemento VGLUT-1 fagocitato (vedere la punta di freccia) (Fig.C.)  
 Analisi della componente C3 del complemento per i topi SD e CSR tramite il western blot (Fig.F)  
 Livelli proteici di citochine e chemochine nel liquor cerebrospinale nei gruppi S,SD e CSR (Fig. G)



Percentuale di VGLUT1 fagocitato all'interno della microglia, rispetto al numero totale (Fig .D)

Volume degli elementi fagocitati nei tre gruppi (S), (SD) e (CSR) (Fig.E)



# DISCUSSIONE

Questo studio mostra che la privazione acuta del sonno e la perdita cronica del sonno aumentano l'attività fagocitaria mediata dagli astrociti nel neuropilo corticale del topo, mentre solo la perdita cronica del sonno può innescare la fagocitosi microgliale.

Negli astrociti, la fagocitosi è associata ad una maggiore espressione MERTK e perossidazione lipidica, mentre la fagocitosi microgliale è associata ad alti valori del componente C3 del complemento senza evidenti segni di infiammazione nel CSF.

Solo poche sinapsi subiscono la fagocitosi astrocitaria: L'80% di tutte le sinapsi eccitatorie più grandi sono il target dei prolungamenti periferici degli astrociti, ma solo meno del 10% di esse è fagocitato

L'attivazione della via biochimica di MERTK può iniziare durante la veglia spontanea ma le sue conseguenze strutturali a lungo termine diventano evidenti solo dopo una perdita di sonno prolungata. MERTK riconosce i segnali che attivano la fagocitosi astrocitaria. Uno di questi è l'esposizione sull' lato esterno della membrana di un fosfolipide del bilayer, la fosfatidilserina, che normalmente si trova sull' lato interno

L'aumento della concentrazione di calcio, l'esaurimento dell'ATP e lo stress ossidativo sono tutti fattori collegati all'attività e al metabolismo cellulare che inducono la traslocazione della fosfatidilserina sulla parte esterna della membrana. Un'alta attività metabolica delle sinapsi più grandi ed usate potrebbe favorire l'esternalizzazione della fosfatidilserina

Le cellule microgliali, che sono le cellule immunitarie innate residenti nel cervello, mediano la risposta infiammatoria e riparatrice causata da danni cerebrali

La carenza di sonno provoca l'attivazione della microglia senza segni di neuroinfiammazione; questa attivazione può però aumentare la suscettibilità del cervello a processi neurodegenerativi

# CONCLUSIONE

L'attività fagocitaria degli astrociti a livello della zona presinaptica nelle sinapsi di grandi dimensioni è sovraregolata già dopo poche ore di privazione del sonno e si accentua dopo una privazione prolungata e severa; questi risultati suggeriscono che quest'attività fagocitaria serva per ripulire le sinapsi poco importanti che si sono formate durante la veglia prolungata. La restrizione cronica del sonno ma non quella acuta, promuove inoltre l'attività fagocitaria della microglia senza evidenti segni di neuro-infiammazione; questo evento però, se protratto nel tempo, potrebbe aumentare la suscettibilità cerebrale ad altre forme di danno.