UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche

Classe LM-9

Studio optogenetico sulle proprietà della trasmissione sinaptica inibitoria nelle corna dorsali del midollo spinale di topo

Relatore

Prof.ssa Rita Bardoni

Co-relatore

Dott. Andrea Bighinati

Tesi di Laurea di

Valentina Antonia Giacco

Anno Accademico 2025-2026

INDICE

ABSTRACT *1*

INTRODUZIONE *2*

1. LE CORNA DORSALI DEL MIDOLLO SPINALE **3**

1.1 Lamina I 5

1.2 Lamina II 6

1.3 Fibre afferenti primarie 7

1.4 Afferenze nocicettive 7

1.5 Il circuito dolorifico 8

1.6 Gli interneuroni inibitori e i loro marker 9

1.7 L'inibizione GABAergica e glicinergica 10

1.8 Il dolore come conseguenza della disinibizione spinale 11

1.9 L'optogenetica 12

MATERIALI E METODI *14*

2.1 ANIMALI **15**

2.2 GENOTIPIZZAZIONE **15**

2.3 IMMUNOFLUORESCENZA **17**

2.4 PROTOCOLLO DI DISSEZIONE E PREPARAZIONE DELLE FETTINE DI MIDOLLO SPINALE **18**

2.5 LA TECNICA DEL PATCH-CLAMP 20

2.5.1 PATCH-CLAMP: Le basi della tecnica 21

2.5.2 PATCH-CLAMP: la strumentazione per le registrazioni 23

2.5.3 PATCH-CLAMP: Le registrazioni.....23

2.6 ATTIVAZIONE DEL CANALE ChR2 MEDIANTE STIMOLAZIONE OTTICA 25

RISULTATI 26

CONCLUSIONI.....34

BIBLIOGRAFIA 38

ABSTRACT

L'elaborazione dello stimolo somatosensoriale nocicettivo a livello spinale coinvolge un complesso circuito di fibre e di neuroni che insieme concorrono a far viaggiare tale informazione verso i centri superiori per l'elaborazione finale. A livello delle lamine I,II e V delle corna dorsali del midollo spinale, dove terminano le fibre afferenti primarie nocicettive Aδ e C, vi è una tale varietà di tipi cellulari che rende difficoltosa sia la comprensione dei meccanismi fisiologici di trasmissione del dolore che dei processi patologici che si instaurano quando vie eccitatorie ed inibitorie non sono più in equilibrio e che conducono a condizioni di dolore cronico.

Partendo, quindi, dalle conoscenze di base e dalle più recenti evidenze, il nostro lavoro si è incentrato sulla caratterizzazione della trasmissione sinaptica inibitoria a livello delle corna dorsali di midollo spinale di topo sfruttando un modello animale che ci consentisse di compiere esperimenti di elettrofisiologia e di optogenetica su popolazioni identificate di interneuroni, eccitatori e inibitori.

I risultati da noi ottenuti ci hanno consentito di far luce su quelle che sono le proprietà elettrofisiologiche di tali interneuroni. In particolare, il nostro studio ha evidenziato come le risposte sinaptiche inibitorie registrate da interneuroni eccitatori ed inibitori abbiano proprietà diverse, essendo mediate per la maggior parte da glicina nei neuroni eccitatori e in modo equivalente da GABA e glicina nei neuroni inibitori.

L'auspicio è che, nonostante le evidenti difficoltà nello studio di tali sistemi, l'utilizzo di tecniche sempre più nuove e raffinate permetta di ampliare le conoscenze sui circuiti spinali del dolore, al fine di identificare efficaci bersagli su cui agire nei casi di dolore patologico e migliorare così la qualità della vita del paziente affetto da dolore cronico.

INTRODUZIONE

Il midollo spinale è un organo del Sistema Nervoso Centrale deputato alla trasmissione bidirezionale di segnali sensoriali e motori, al controllo dei riflessi rapidi e, con i motoneuroni alla gestione dei movimenti muscolari. È situato all'interno del canale vertebrale protetto non solo da strutture ossee come le vertebre ma anche da una serie di membrane, le meningi.

Le meningi sono degli involucri connettivali altamente vascolarizzati, organizzate in tre strati differenti. Il primo strato più interno e adeso al midollo spinale è la *pia madre* connessa allo strato intermedio, detto *aracnoide.* Tra queste due membrane c'è lo spazio subaracnoideo all'interno del quale circola il liquido cefalorachidiano. Lo strato più esterno è, invece, la *dura madre* ossia una membrana rigida costituita perlopiù da tessuto fibroso.

Il midollo spinale appare, quindi, come un lungo cordone cilindrico biancastro di circa 40-50cm che in sezione trasversale mostra una porzione più esterna contenente sostanza bianca e una più interna, di sostanza grigia, dalla tipica forma a farfalla.

La sostanza grigia è prevalentemente composta dai corpi cellulari dei neuroni, dendriti e cellule gliali e si caratterizza per la presenza di due corna anteriori (con i motoneuroni) e due corna posteriori (con i neuroni sensitivi) collegate attraverso la commessura grigia.

Le due corna posteriori o dorsali del midollo spinale sono quelle in cui si verifica la prima modulazione dello stimolo doloroso poiché, è a questo livello che vengono ricevuti gli stimoli sensitivi, tattili, dolorifici, termici e propriocettivi.

Nonostante non siano ancora del tutto chiari i circuiti coinvolti a livello dolorifico, le conoscenze insegnano che l'elaborazione degli stimoli sensoriali si basa sull'equilibrio tra uno stato eccitatorio e uno stato inibitorio.

Pertanto, i cambiamenti che si verificano nelle corna dorsali del midollo spinale in risposta al dolore potrebbero renderle il bersaglio ultimo per l'avanzamento di strategie terapeutiche.

1. LE CORNA DORSALI DEL MIDOLLO SPINALE

I primi studi effettuati da Rolando (1824) sulle corna dorsali (o posteriori) evidenziarono la presenza di una zona traslucida superficiale chiamata *sostanza gelatinosa* a causa della mancanza di mielina in questa regione.

Successivamente, Rexed (1952) osservò, prima nel gatto e poi in altre specie, un'organizzazione laminare, estesa lungo tutto il midollo spinale, basata su dimensione e morfologia delle cellule neuronali che compongono le corna dorsali stesse (Watson et al., 2009)

- La lamina I, all'apice del corno, riceve gli stimoli somatosensoriali tattili e dolorifici.
- La lamina II è posta a livello della sostanza gelatinosa di Rolando necessaria a modulare la sensibilità termica e il dolore.
- Le lamine III e IV, nel nucleo proprio del corno posteriore, elaborano stimoli sensitivi tattili.
- La lamina V del nucleo reticolare spinale è coinvolta nella trasmissione del dolore
- La lamina VI alla base del corno dorsale, riceve stimoli propriocettivi.
- Le lamine VII-X sono localizzate nelle zone intermedie e anteriori delle corna dorsali.

(Peirs et al., 2020)

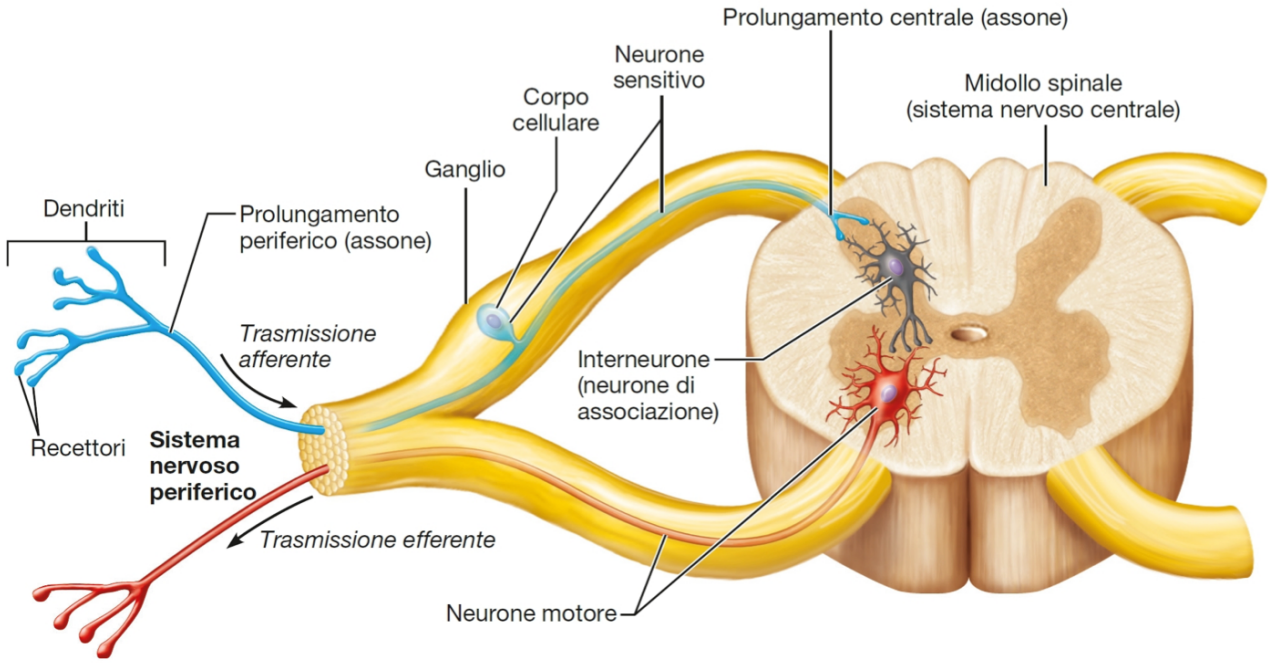


Figura 1. *Rappresentazione delle vie afferenti ed efferenti che trasmettono l'informazione dal SNP al SNC (Marieb and Keller, n.d.)*

La colorazione di Nissl delle corna dorsali permette di identificare popolazioni cellulari diverse per densità, morfologia e proprietà intrinseche. La lamina I è, infatti, uno strato sottile che contiene i corpi cellulari di neuroni di varie dimensioni. Al contrario, la lamina II contiene i corpi cellulari di piccoli neuroni densamente compattati (Watson et al., 2009).

Il margine tra la lamina III e IV risulta più difficile da investigare per l'eterogeneità delle dimensioni dei neuroni che le caratterizza. La lamina V è caratterizzata da un'elevata densità cellulare con numerose afferenze mieliniche che formano la zona reticolata, al contrario della lamina VI che, invece, mostra una più bassa densità cellulare.

La maggior parte dei neuroni delle corna dorsali sono interneuroni, presenti soprattutto a livello delle lamine I e II. L'eterogeneità neuronale a livello delle corna dorsali riflette la complessità nell'integrazione e modulazione degli impulsi somatosensoriali prima che questi raggiungano le regioni sopraspinali. Esiste, infatti, una fitta rete di interazioni che convergono nei circuiti del dolore. Gli interneuroni possono essere classificati in due gruppi principali sulla base dei neurotrasmettitori prodotti. Nelle corna dorsali, tutti gli interneuroni eccitatori sono glutammatergici ed esprimono il trasportatore vescicolare VGLUT2. Al contrario, gli interneuroni inibitori rilasciano l'acido γ-aminobutirrico (GABA) e/o glicina, ed esprimono il trasportatore VGAT (Peirs et al., 2020).

1.1 Lamina I

Lo studio degli scienziati Lima e Coimbra (1986) ha identificato nella lamina I tre diverse tipologie di cellule neuronali morfologicamente distinte in piramidali, multipolari e fusiformi. Le cellule piramidali hanno un corpo cellulare triangolare con i dendriti che rimangono nella lamina I, nell'asse medio-laterale. Le cellule multipolari hanno un corpo cellulare tondo e i dendriti che hanno diverse direzioni mentre le cellule fusiformi hanno un corpo cellulare allungato nell'asse rostro-caudale, con i dendriti bipolari allungati, e corpi cellulari rotondi nelle sezioni trasversali (Prescott and Koninck, 2002)

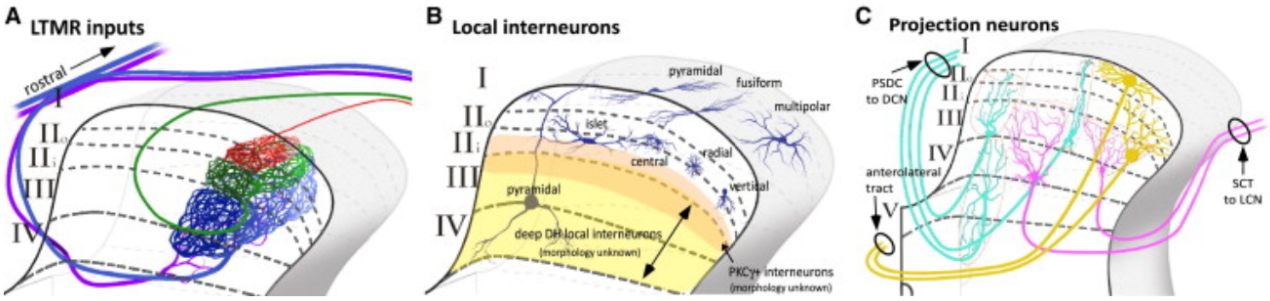


Figura 2. A, B, C *Le componenti neuronali delle corna dorsali del midollo spinale (Abraira and Ginty, 2013).*

Studi di Patch-Clamp hanno evidenziato che esiste una correlazione tra la morfologia cellulare e il corrispettivo pattern di scarica di potenziale d'azione. Pertanto, i neuroni della lamina I vengono identificati come *tonici* o *'tonic'* se hanno una scarica di potenziale lenta ma continua, *fasici o 'phasic'* se hanno una scarica ad alta frequenza ma di durata variabile, *ritardati o 'delayed'* quando hanno un ritardo rispetto al primo picco, e *a picco singolo o 'single spike'* quando scaricano un singolo potenziale d'azione anche in caso di forte depolarizzazione della membrana.
Sulla base di ciò i neuroni fusiformi sono tipicamente tonici, quelli piramidali sono fasici e le cellule multipolari sono ritardate o a scarica singola.

1.2 Lamina II

Per la classificazione degli interneuroni della lamina II sono stati utilizzati due principali approcci sperimentali, tra cui l'osservazione della morfologia somatodendritica e il pattern di attivazione in risposta alla scarica di potenziale d'azione. Nella più recente classificazione di Grudt e Pearl (2002) sono state identificate quattro classi principali, ossia cellule verticali, radiali, centrali e islet (Todd, 2010).

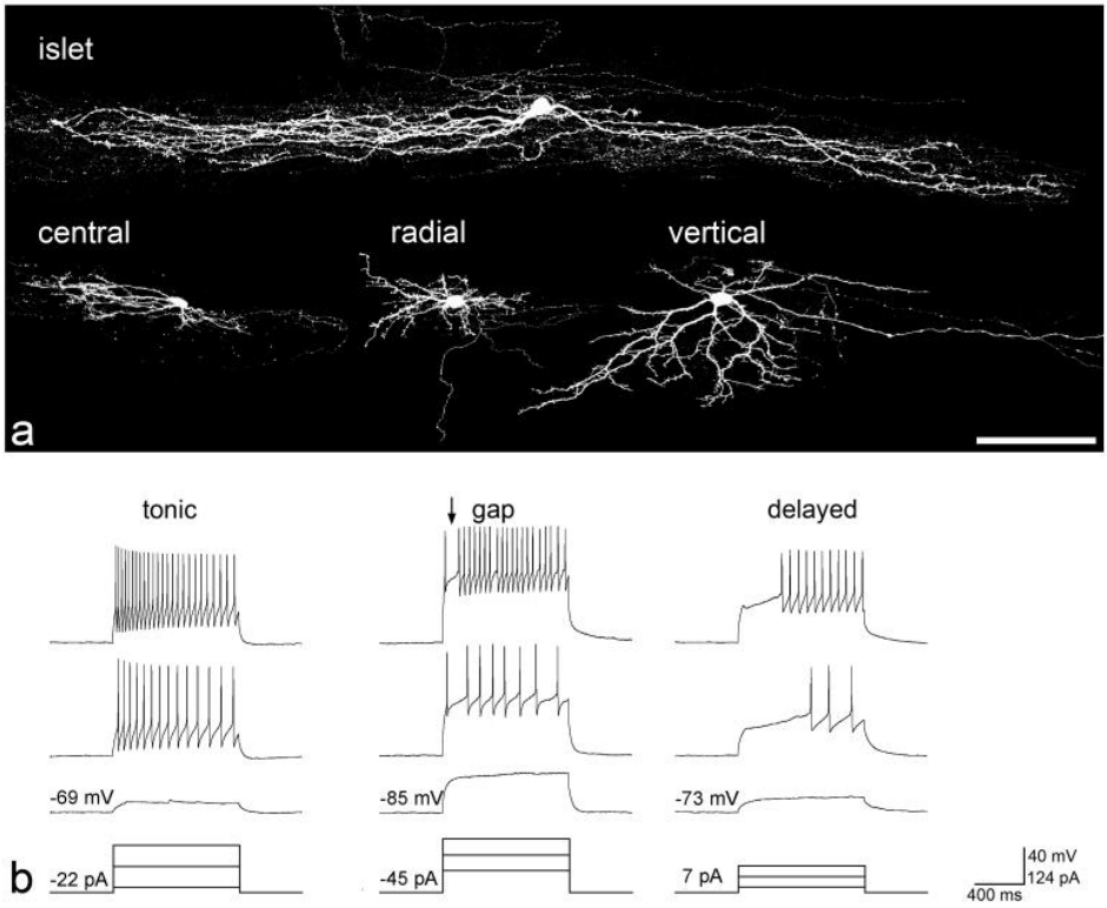


Figura 3. A *Immagine al microscopio confocale che mostra i quattro tipi di interneuroni marcati con Neurobiotina dopo registrazione patch-clamp dell'intera cellula. La colorazione immunoistochimica degli assoni, con anticorpi contro il trasportatore vescicolare del glutammato VGLUT2 e contro il trasportatore vescicolare del GABA, VGAT, ha rivelato che la cellula islet, in particolare, era GABAergica.* ***B.*** *Pattern di attivazione in risposta al potenziale d'azione (Todd, 2010).*

Le cellule "islet" hanno alberi dendritici allungati (>400µm di lunghezza) nell'asse rostro-caudale, con scarsa diffusione dorso-ventrale. Le cellule centrali hanno caratteristiche simili ma con alberi dendritici più corti (<400µm di lunghezza). Le cellule radiali presentano alberi dendritici compatti con i dendriti primari che irradiano in direzioni differenti. Le cellule verticali, infine, hanno un corpo cellulare disposto dorsalmente mentre i dendriti si aprono a ventaglio ventralmente (Peirs et al., 2020; Punnakkal et al., 2014).

1.3 Fibre afferenti primarie

Le corna dorsali del midollo spinale, in particolare le lamine I e II, ricevono le informazioni sensoriali dalle fibre afferenti primarie che innervano la cute e i tessuti più profondi del corpo e rispondono a stimoli nocivi e non-nocivi.

I corpi cellulari di questi neuroni risiedono nei gangli delle radici dorsali (DRG), i loro prolungamenti risultano altamente organizzati sia in base alla modalità sensoriale che alla lamina del corno dorsale in cui terminano.

La maggior parte delle grandi afferenze cutanee mielinizzate (Aβ) sono dei meccanocettori a bassa soglia che rispondono al tatto, mentre la maggior parte delle fibre mielinizzate fini (Aδ) e amieliniche (C) sono nocicettori o termocettori (Lucas-Romero et al., 2025).

1.4 Afferenze nocicettive

Le afferenze nocicettive e termorecettive, sia mieliniche (Aδ) che amieliniche (C), innervano la lamina I e gran parte della lamina II. Le fibre C non mielinizzate e lente vengono suddivise in due principali gruppi neurochimici: fibre peptidergiche e non peptidergiche.

Le prime sono perlopiù associate agli strati più superficiali dell'epidermide; le seconde, invece, innervano altri tessuti e gli strati più profondi dell'epidermide stessa.

Le afferenze peptidergiche esprimono i recettori per i fattori di crescita, tra cui NGF-TrkA e rilasciano la sostanza P e il CGPR dai terminali periferici provocando vasodilatazione e aumento della permeabilità (Basbaum et al., 2009).

Le afferenze non peptidergiche non rilasciano neuropeptidi come la sostanza P o il CGRP, ma esprimono i recettori purinergici P2X3, cioè dei canali ionici dipendenti dall'ATP extracellulare, e sono caratterizzate dal legame con l'isolectina B4 (IB4) altamente sensibile ai fattori neurotrofici, come il GDNF e contribuiscono ampiamente alla sensibilizzazione periferica, aumentando la risposta al dolore.

È stato osservato che durante lo sviluppo embrionale entrambe queste classi di fibre sono sensibili al fattore neurotrofico NGF ma dopo la nascita, solo le fibre peptidergiche continuano a rispondere all'NGF esprimendo il recettore ad alta affinità TrkA; le fibre non peptidergiche esprimeranno, invece, il fattore neurotrofico GDNF e il recettore purinergico P2X3(Basbaum et al., 2009).

Il secondo tipo di afferenza nocicettiva sono le fibre Aδ ovvero fibre di piccolo calibro mielinizzate che svolgono un ruolo cruciale nel sistema somatosensoriale poiché coinvolte nella trasmissione del primo dolore, definito 'puntorio', cioè rapido e acuto.

Questo le distingue dalle fibre Aβ che sono fortemente mielinizzate, hanno calibri maggiori e trasmettono sensazioni tattili e vibratorie non dolorose.

Le fibre Aδ terminano prevalentemente nelle lamine I, II e V delle corna dorsali del midollo spinale all'interno delle quali formano sinapsi. Esistono due sottotipi di fibre Aδ (tipo I e II) che differiscono per la diversità recettoriale.

Le fibre Aδ di tipo I sono caratterizzate da meccanocettori ad alta soglia che rispondono principalmente a stimoli meccanici intensi, mentre le fibre di tipo II hanno recettori meccanotermici sensibili ad alte temperature e altre che rispondono al freddo intenso. La mielinizzazione di queste fibre contribuisce alla loro maggiore velocità di conduzione rispetto alle fibre C non mielinizzate.

I potenziali d'azione delle fibre afferenti sensoriali vengono generati quando il potenziale generatore raggiunge la soglia di attivazione per i canali del sodio con successiva depolarizzazione di membrana e propagazione lungo l'assone. I canali del sodio e del potassio voltaggio-dipendenti sono essenziali per regolare i potenziali d'azione stessi e la loro frequenza di carica (Koch et al., 2018).

Le fibre Aδ esprimono dei canali ionici acido-sensibili che svolgono un ruolo cruciale nella nocicezione. Questi canali si aprono in risposta ad un abbassamento di pH (acidosi) extracellulare consentendo l'ingresso di ioni, principalmente di sodio, all'interno della cellula. Uno di questi canali è il TRPV1 che risulta essere sensibile al fattore neurotrofico NGF, il quale ne induce fosforilazione aumentando la sensibilità del canale stesso alle variazioni di pH.

Le afferenze primarie, i cui corpi cellulari risiedono nei gangli delle radici dorsali, trasmettono gli stimoli sensoriali dalla periferia al SNC. Gli assoni terminali di queste fibre giungono nelle corna dorsali del midollo spinale dove rilasciano glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio, che va ad attivare i neuroni di second'ordine presenti nelle lamine I, II e V nelle quali le fibre Aδ e C terminano. Gli assoni dei neuroni di second'ordine si incrociano a livello della linea mediana del midollo e risalgono verso i centri superiori formando il tratto spinotalamico. A livello del talamo ha origine il neurone di terz'ordine il quale proietta direttamente alla corteccia somatosensoriale primaria a livello della quale avviene l'elaborazione dello stimolo nocivo.

1.5 Il circuito dolorifico

I neuroni delle corna dorsali del midollo spinale mostrano un'elevata eterogeneità nella morfologia, proprietà elettrofisiologiche e dal punto di vista trascrittomico. Infatti, le lamine di Rexed si differenziano anche per il tipo di neuropeptidi e proteine che vengono in esse rilasciate avvalorando l'idea che il midollo spinale sia caratterizzato da cellule altamente specializzate ognuna con un ruolo ben specifico all'interno del circuito dolorifico.

Lesioni traumatiche e/o condizioni infiammatorie persistenti, possono alterare le normali vie del dolore sfociando, spesso, nel dolore cronico con ripercussioni nella qualità della vita del soggetto afflitto. L'ipotesi più accreditata che spiega un tipo di dolore cronico, chiamato allodinia, è che

l'equilibrio tra le vie di segnalazione eccitatorie e inibitorie tra le popolazioni di neuroni nelle corna dorsali del midollo spinale risulta essere interrotto.
Secondo la *'teoria del cancello'* di Melzack e Wall (1965), infatti, nel normale circuito dolorifico il midollo spinale funge da cancello che modula finemente lo stato inibitorio ed eccitatorio per l'elaborazione dello stimolo doloroso.
Si stima che la maggior parte dei neuroni presenti all'interno delle prime tre lamine delle corna dorsali del midollo spinale siano interneuroni, distinti in due classi in base ai neurotrasmettitori da essi rilasciati. Tutti gli interneuroni eccitatori sono glutammatergici ed esprimono il trasportatore vescicolare del glutammato (VGLUT2) mentre gli interneuroni inibitori rilasciano GABA e/o glicina. Dato che si pensa che l'alterato equilibrio tra le vie eccitatore e inibitorie porti ad una mancata inibizione nei circuiti spinali e ad un'aberrante elaborazione dell'input somatosensoriale, questi interneuroni rappresenterebbero un possibile target per lo sviluppo di nuove terapie di gestione del dolore.

1.6 Gli interneuroni inibitori e i loro marker

Nelle lamine più superficiali delle corna dorsali, i terminali assonici degli interneuroni inibitori contengono sia GABA che glicina confermando di fatto che il meccanismo di inibizione preveda spesso il co-rilascio di entrambi i neurotrasmettitori a seconda che vi siano o meno i rispettivi recettori nei terminali post-sinaptici (Hughes and Todd, 2020).
Le analisi di espressione di fattori di trascrizione, come omeo-domini (HD) e i base helix-loop-helix (bHLH), hanno mostrato elementi chiave nel determinare se gli interneuroni mostrano fenotipi eccitatori o inibitori. Tali elementi, usati come marker per discriminare gli interneuroni eccitatori da quelli inibitori, hanno evidenziato nel topo che circa il 35-53% di neuroni nelle lamine I-III e che il 54-58% di neuroni nelle lamine IV-V sono interneuroni inibitori che co-esprimono PAX2 e GABA ossia il principale neurotrasmettitore inibitorio insieme alla glicina (Lai et al., 2016; Peirs et al., 2020).
Nelle lamine I e II gli interneuroni inibitori possono essere suddivisi in 5 popolazioni distinte in base all'espressione di alcuni marcatori neurochimici: i neuropeptidi galanina e dinorfina (che sono co-espressi), neuropeptide Y, ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS), parvalbumina (PV) e calretinina (CR).
Con i progressi ottenuti nelle tecniche di sequenziamento è stato possibile usare un nuovo approccio per confrontare e suddividere, allo stesso tempo, l'intera popolazione neuronale delle corna dorsali del midollo spinale (Hughes and Todd, 2020).
Esperimenti di scRNA-seq e di snRNA-seq condotti su modelli murini hanno identificato 15 sottotipi di interneuroni inibitori diversi dal punto di vista molecolare e questi corrispondono in gran parte alle

popolazioni neurochimicamente distinte identificate nelle lamine superficiali utilizzando approcci immunoistochimici (Browne et al., 2020).

È importante sottolineare che questi marker non sono tutti esclusivi degli interneuroni inibitori ma sono espressi anche da quelli eccitatori e dalle afferenze primarie. Per questo motivo, non risulta ancora possibile utilizzare esclusivamente tali marker per distinguere le due popolazioni. Attualmente, il metodo più accreditato è frutto di una combinazione tra caratteristiche morfologiche, proprietà elettrofisiologiche e profilo neurochimico.

1.7 L'inibizione GABAergica e glicinergica

Nelle corna dorsali del midollo spinale gli interneuroni inibitori possono mediare due forme diverse di inibizione a seconda che avvenga a livello pre- o post-sinaptico.

L'inibizione pre-sinaptica è mediata dal GABA che, rilasciato dai terminali assonici che fanno sinapsi con le fibre afferenti primarie, va ad agire sul recettore ionotropico $GABA_A$. Il legame del neurotrasmettitore al recettore provoca l'apertura di canali ionici sensibili al Cl^- consentendo l'afflusso di ioni negativi all'interno del neurone con conseguente iperpolarizzazione della membrana. Si genera un potenziale d'azione che, come effetto, produce una risposta inibitoria rapida. L'inibizione postsinaptica è, invece, mediata dal rilascio o dal co-rilascio di GABA e/o glicina nelle sinapsi assodendritiche e assosomatiche (Chen et al., 2014).

Per comprendere questo aspetto, sono stati condotti degli esperimenti di immunoistochimica nei quali si è andati a studiare la subunità β3 del recettore $GABA_A$ e la gefirina, una proteina citoscheletrica che lega la subunità β del recettore glicinergico, al fine di osservare l'espressione dei due recettori (Todd et al., 1996).

La presenza di entrambe le subunità si osserva nei terminali assonici di sinapsi sia GABAergiche/glicinergiche che esclusivamente GABAergiche, motivo per il quale la gefirina viene considerata un marker affidabile di sinapsi inibitorie nelle lamine I, II e III delle corna dorsali.

Non si è osservato lo stesso nelle sinapsi assoassoniche a livello dei terminali delle fibre afferenti primarie, eccezion fatta per le fibre C-peptidergiche, nelle quali si è osservata l'esclusiva espressione dei recettori $GABA_A$ ma non della gefirina né di subunità funzionali dei recettori glicinergici, supportando l'ipotesi che a livello dei gangli delle radici dorsali, nelle quali sono localizzati i corpi cellulari di tali fibre, non ci sia azione glicinergica (Hughes and Todd, 2020; Todd et al., 1996).

Tali osservazioni supportano dati ottenuti mediante registrazioni elettrofisiologiche per le quali, quindi, l'inibizione pre-sinaptica è mediata principalmente dal recettore $GABA_A$ mentre l'inibizione post-sinaptica può essere mediata da GABA, glicina o dalla co-trasmissione di entrambi i neurotrasmettitori.

1.8 Il dolore come conseguenza della disinibizione spinale

La perdita di inibizione spinale è stata identificata come la principale responsabile dello sviluppo di condizioni patologiche legate al dolore. L'ipotesi inizialmente proposta fu che una lesione del nervo periferico porta ad una selettiva perdita di interneuroni inibitori, nelle lamine I e II delle corna dorsali, per apoptosi. Poiché non si sono trovati effettivi riscontri, sono stati valutati altri meccanismi che spiegano l'aumentata eccitabilità delle corna dorsali in condizioni di dolore cronico (Latremoliere and Woolf, 2009; Moore et al., 2002).

La prima tra queste è che a seguito di una lesione al nervo periferico si abbia una down-regolazione del trasportatore KCC2 con conseguente rilascio del fattore neurotrofico BDNF, il quale legandosi al suo recettore, TrkB, attiva la via delle MAPK e PI3K, amplificando la trasmissione eccitatoria del dolore. La down-regolazione di KCC2 implica, invece, che le correnti di Cl- non siano più regolate diminuendo, di fatto, l'inibizione mediata da GABA e glicina (Wei et al., 2013).

Per quanto concerne il circuito dolorifico che si attiva a seguito della perdita di inibizione spinale prevede il coinvolgimento di una classe di interneuroni inibitori che esprimono parvalbumina (iPVINs) e il reclutamento delle cellule verticali.

Questi interneuroni, localizzati nella parte più interna della lamina II e nella lamina III, co-esprimono GABA e glicina e sembrano avere un ruolo fondamentale nel condurre gli input dei meccanocettori a bassa soglia (A-LTMR) nelle corna dorsali dato che, una loro ablazione in topi giovani, induce delle risposte simili all'allodinia a seguito di stimoli meccanici.

Il co-rilascio di entrambi i trasmettitori da parte degli interneuroni inibitori PV+ media due tipi di inibizione necessarie a prevenire il dolore. Il primo tipo è un'inibizione pre-sinaptica mediata dal GABA nelle sinapsi asso-assoniche impedendo che gli input provenienti dalle A-LTMR deviino verso i circuiti del dolore. La seconda, è un'inibizione post-sinaptica mediata da GABA e glicina che agendo sulle cellule delle corna dorsali mediano l'eccitabilità complessiva (Hughes and Todd, 2020) (Boyle et al., 2019).

La mancata inibizione mediata dagli interneuroni PV+ innesca una reazione a catena che conduce all'attivazione del circuito dolorifico nella lamina I. A livello pre-sinaptico i meccanocettori a bassa soglia (A-LTMC), che mediano gli stimoli del tatto leggero, entrano nel midollo spinale senza alcun tipo di gating mentre, a livello post-sinaptico, si genera un'ipereccitabilità delle cellule verticali.

Altro effetto che si osserva, quando l'inibizione degli interneuroni PV+ viene meno a seguito di una lesione al nervo periferico, è che risulta compromessa anche l'inibizione esercitata sugli interneuroni eccitatori che esprimono PKCγ che diventano anch'esse cellule iperattive deviando la trasmissione del segnale tattile verso i circuiti dolorifici.

Se la disinibizione spinale non può essere spiegata da fenomeni di apoptosi appare più plausibile che, a seguito di una lesione al nervo periferico, si abbia un cambiamento nelle proprietà funzionali degli interneuroni PV+. Si è visto, infatti, che questi interneuroni inibitori necessiterebbero di un'iniezione di corrente elettrica significativa per mantenere una scarica continua di impulsi e che a parità di corrente ricevuta, gli interneuroni lesionati, rilasciano meno neurotrasmettitori inibitori (Petitjean et al., 2015).
Deficit nelle proprietà funzionali degli interneuroni inibitori sembrano essere, quindi, la causa principale della disinibizione spinale con conseguenti malfunzionamenti del circuito dolorifico.

1.9 L'optogenetica

Tecnica nata intorno ai primi anni 2000 l'optogenetica si serve di alcune molecole fotosensibili, le opsine microbiche o anche dette 'attuatori optogenetici'. Veicolate all'interno di specifiche popolazioni neuronali di interesse, ne consentono la manipolazione e, mediante attivazione o inibizione dell'impulso nervoso, permettono di osservare il comportamento cellulare per studiare circuiti e funzioni a livello delle corna dorsali del midollo spinale. Si tratta di proteine canale diverse per il tipo di ioni trasportati e i relativi effetti.
L'opsina eccitatoria più utilizzata in tale ambito, isolata dall'alga *'Chlamydomonas reinhardtii',* è la ChannelRhodopsin-2 (ChR2) ossia, un canale cationico non selettivo permeabile a Na^+, K^+ e Ca^{2+} che eccitata da luce blu, con un picco di assorbimento a 470nm, determina depolarizzazione della membrana e conseguente innesco del potenziale d'azione (Zhang et al., 2011).
Di contro, la principale opsina inibitoria è l'Archerhodopsine-3 (ArchT) ossia una pompa protonica che attivata da luce verde a 530nm media un trasporto attivo di protoni nell'ambiente extracellulare e quindi, iperpolarizzazione della membrana.
Il delivery delle opsine all'interno di specifiche popolazioni cellulari, quali neuroni o astrociti, può essere mediato dal sistema di ricombinazione fagico, attraverso modelli transgenici, dispendiosi ma poco invasivi, o attraverso un vettore virale. Quest'ultima tecnica, seppur invasiva, a livello della pathway somatosensoriale viene utilizzata per trasdurre i neuroni dei gangli delle radici dorsali mediante iniezione periferica o diretta del nervo sciatico (Harding et al., 2020).
La ChannelRhodopsin-2 è stata impiegata per studiare, in modelli animali, i circuiti spinali confrontando le diverse popolazioni neuronali in cui era stata selettivamente veicolata. Nelle fibre afferenti primarie di tipo C, peptidergiche e non peptidergiche che esprimono TrpV1 e MrgD, la stimolazione periferica della zampa posteriore dell'animale, con un impulso luminoso a 488nm, ha condotto in entrambi i casi a delle risposte nocicettive, leggermente differenti solo per il tipo di comportamento. Il tipo di risposta che si osserva quando, invece, la stimolazione periferica è ripetuta

è iperalgesia sia termica che meccanica che persiste anche quando lo stimolo viene interrotto (Bonin and De Koninck, 2014).

Dalla stimolazione periferica si è poi passati alla stimolazione 'centrale' del midollo spinale utilizzando un impianto composto da una fibra ottica e da un puntale che vengono posizionati a livello del segmento vertebrale T13 o L1 al di sopra del tratto spinale L4/L5. La stimolazione diretta delle fibre primarie afferenti a livello dei gangli delle radici dorsali avviene mentre l'animale è libero nei movimenti grazie ad un impulso luminoso che viene condotto dal filo in fibra ottica collegato ad una sorgente luminosa esterna.

L'applicazione dell'optogenetica in esperimenti in vivo ha contribuito significativamente allo studio del circuito dolorifico e ha avvalorato l'ipotesi che la perdita di inibizione spinale sia tra le cause principali dell'aumento di sensibilità in condizioni patologiche di dolore. Sono stati studiati, a tal proposito, i neuroni inibitori GAD2+/ArchT, che stimolati da luce verde a 530nm, venivano inibiti, producendo un incremento della sensibilità meccanica ma non di quella termica (Bonin et al., 2016).

L'optogenetica può essere anche performata in vitro, su sezioni di midollo, accompagnata da registrazioni elettrofisiologiche su popolazioni distinte, ad esempio interneuroni VGAT+ o GAD2+, col fine di delineare i circuiti spinali e di chiarire il contributo di ciascun elemento nell'elaborazione dello stimolo somatosensoriale (Tashima et al., 2018).

È una tecnica che presenta alcune criticità, tra cui la possibile stimolazione di una popolazione cellulare off-target o il fatto che la sostanza bianca del midollo spinale sia ricca di fibre mieliniche che possono alterare la conduzione dell'impulso luminoso.

Allo stesso tempo, però, appare essere uno strumento di ricerca valido per lo studio del circuito somatosensoriale stesso e la caratterizzazione degli elementi coinvolti in condizioni patologiche di dolore (Harding et al., 2020).

MATERIALI E METODI

2.1 ANIMALI

Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati condotti su topi transgenici derivanti dal ceppo C57BL/6J e denominati B6.Cg-Tg (Slc32a1-COP4*H134R/EYFP) 8Gfng/J – Strain #:014548 (Jackson Laboratories, Maine, Stati Uniti). Questi topi esprimono il canale ionico *ChannelRhodopsin2* (ChR2) e la *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP) sotto il controllo del promotore del trasportatore vescicolare VGAT, un promotore altamente specifico per i neuroni GABAergici e glicinergici. Questo modello animale risulta molto utile per lo studio dei circuiti neuronali mediante esperimenti di optogenetica.

I topi sono mantenuti in stabulazione in gabbie standard a temperatura ambiente con cicli di luce e buio di 12h ciascuno. Cibo e acqua erano disponibili *ad libitum*.

Gli esperimenti sono stati condotti su animali, di entrambi i sessi e di età compresa tra i 15 e 30 giorni post-natali. Tutte le procedure sperimentali si sono svolte con l'approvazione del Ministero Italiano della Salute (codice progetto 74D0D.N.0B8 del 09/03/2025) nel rispetto delle linee guida 3R per la riduzione del numero di animali sperimentali.

2.2 GENOTIPIZZAZIONE

Tutti gli animali sperimentali sono stati genotipizzati per valutare la presenza nel genoma dell'amplificato di PCR della sequenza dell'EYFP. All'età di 20 giorni, agli animali è stato prelevato un punch di cute dall'orecchio, da cui sono stati estratti gli acidi nucleici e successivamente è stato purificato il DNA genomico. Negli animali transgenici B6.Cg-Tg, è possibile osservare la presenza di EYFP, usata come marcatore della presenza di ChR2, in quanto entrambi sono espressi sotto il controllo del promotore di VGAT in questo modello murino.

Per l'estrazione degli acidi nucleici e la successiva purificazione del DNA dai tessuti prelevati è stato utilizzato il kit Zymo Research – Quick-DNA Miniprep Plus (Zymo Research, Irvine, CA, Stati Uniti) che consente un'alta purificazione del DNA combinando metodi chimici ed enzimatici.

Brevemente, i tessuti vengono lisati a 55°C per 3 ore in una soluzione contenente 95 µl di H_20 bidistillata autoclavata, 95 µl di Solid Tissue Buffer e 10 µl di Proteinasi K. Dopo le 3 ore si aggiungono 2 volumi di Genomic Binding Buffer miscelando con una pipetta. Questo reagente ha un alto contenuto di sali che favoriscono il legame alle membrane di silicio presenti nelle colonnine del kit Zymo. La miscela è trasferita in una colonnina Zymo-Spin™ IIC-XLR e centrifugata a ≥ 12000 g per 1 minuto. Il DNA è ora legato alla membrana della colonnina Zymo-Spin™ IIC-XLR ed è possibile scartare l'eluato prima di procedere ai punti successivi.

A questo punto ai campioni vengono aggiunti 400 µl di DNA Pre-Wash Buffer e successivamente vengono centrifugati alle condizioni precedenti. Dopo aver scartato l'eluato, si aggiungono 700 µl di g-DNA Wash Buffer e si procede come prima centrifugando le colonnine. Questo ultimo passaggio

si ripete una seconda volta aggiungendo solamente 200 µl di g-DNA Wash Buffer. Questi lavaggi sono importanti per ridurre eventuali contaminanti del DNA. Per eluire il DNA genomico, si aggiungono 50 µl di DNA Elution Buffer alle colonnine e dopo averle incubate a temperatura ambiente per 5 minuti, si centrifugano alle condizioni precedenti. Terminata la procedura di estrazione e purificazione del DNA genomico sono state misurate le concentrazioni allo spettrofotometro Nanophotometer NP80 (Implen, Monaco, Germania) dei diversi campioni.
Per amplificare il DNA genomico della EYFP, usata come marcatore dei topi transgenici, sono stati utilizzati primers specifici riportati in tabella 1.

*Tabella 1: Lista dei primers utilizzati per genotipo B6.Cg-Tg (Slc32a1-COP4*H134R/EYFP)8Gfng/J*

Primer	Sequenza 5'→3'	Temperatura di Melting
10493	GCAAGGTAGAGCATAGAGGG	62°C
11677	TCTGTTCCCAGGTCGGCAGC	66°C
oIMR7338	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	68°C
oIMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	74°C

Per ogni campione sono stati utilizzati 100 ng di DNA genomico come templato, l'amplificazione è stata ottenuta utilizzando la polimerasi Taq Hot Start (Promega, Madison, WI, Stati Uniti) in una mix riportata in tabella 2.

Tabella 1: Reagenti e concentrazioni utilizzati per la mix di amplificazione

Reagenti	[ ] Iniziali	[ ] Finali	V Finale
Flexi Buffer	5X	1X	5µl
$MgCl_2$	25mM	1mM	1µl
10493	10µM	0.3µM	1.25µl
11678	10µM	0.3µM	1.25µl
oIMR8744	10µM	0.3µM	1.25µl
oIMR8745	10µM	0.3µM	1.25µl
GoTaq Hot Start	5U/µl	0.75U	0.15µl
DNA genomico	100 ng	100 ng	Variabile
H_20	N/A	N/A	Fino a 25 µl

L'amplificazione del DNA genomico di EYFP mediante i primers utilizzati è stata effettuata sul termociclatore Applied Biosystems 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Stati Uniti). Il protocollo di amplificazione è riportato nella tabella 3.

Tabella 2: Protocollo di amplificazione.

Step	Temperatura	Tempo	Ciclo
Denaturazione iniziale	95°C	2 minuti	
Denaturazione	95°C	30 secondi	Ciclo 1
Annealing	65°C	30 secondi	10X
Estensione	68°C	30 secondi	
Denaturazione	95°C	30 secondi	Ciclo 2
Annealing	60°C	30 secondi	28X
Estensione	72°C	20 secondi	
Estensione Finale	72°C	5 minuti	
Hold	4°C	∞	

Al termine della reazione, gli amplificati di PCR sono stati fatti correre su gel di Agarosio 1% per la successiva analisi di elettroforesi. Le immagini del gel marcato 0.3 μg/ml di etidio bromuro sono state acquisite al ChemiDoc (Biorad, Hercules, CA, Stati Uniti). Per la corsa elettroforetica su gel di agarosio 1% sono stati inseriti nel primo pozzetto 2 μl di marcatore di peso molecolare, il 100bp ladder (Promega) per osservare sul gel le bande corrispondenti di ciascun campione. Inoltre, per verificare la bontà dell'esperimento, è stato inserito un controllo finale 'B' per visualizzare le eventuali contaminazioni nella procedura. Gli animali transgenici mostrano un amplificato a circa 400 paia di basi e un amplificato di controllo a circa 200 paia di basi.

2.3 IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza è una tecnica che consente la marcatura, diretta o indiretta, di antigeni presenti in un tessuto e la successiva visualizzazione mediante microscopia a fluorescenza. Il tessuto midollare è stato prelevato da animali di età adulta e fissato per 24 ore in paraformaldeide al 4% (Sigma Aldrich, Burlington, MA, Stati Uniti). I tessuti sono stati successivamente criopreservati in saccarosio al 30% per 24 ore prima di includerli in Tissue Tek OCT embedding media (Thermo Fisher, Waltam, MA, Stati Uniti) e congelarli in ghiaccio secco. Successivamente, i midolli di animali B6.Cg-Tg sono stati sezionati al criostato per ottenere sezioni di tessuto di 14 μm. I tessuti su vetrino sono stati prima reidratati con PBS e, successivamente, post-fissati per 30 minuti con paraformaldeide al 4% prima di

procedere alla marcatura con anticorpi. Brevemente, i tessuti sono stati incubati con una soluzione di blocking composta da BSA al 3% e TWEEN20 0.1% per un'ora a temperatura ambiente per bloccare i siti di legame aspecifici. Successivamente sono stati incubati O/N a 4°C con una soluzione di anticorpi primari contenente: mouse α-VGAT 1:100 (SYSY, Göttingen, Germania) e rabbit α-YFP 1:300 (Thermo Fisher).

Il giorno successivo, i tessuti sono stati lavati con PBS per rimuovere l'eccesso di anticorpo primario e successivamente incubati per 2 ore a temperatura ambiente con una soluzione contenente: goat α-mouse AlexaFluor 568 1:500 (Thermo Fisher) e donkey α-rabbit AlexaFluor 488 1:500 (Thermo Fisher). Per ovviare ai problemi di cross-reattività, gli anticorpi secondari sono stati scelti di specie diverse rispetto ai primi. Infine, per la colorazione dei nuclei è stato utilizzato DAPI 1:500 (Sigma Aldrich) il cui picco di eccitazione e di emissione sono rispettivamente a 358nm e 461nm.

L'acquisizione delle immagini del tessuto marcato con gli anticorpi specifici è stata ottenuta mediante il microscopio a fluorescenza Zeiss Axio Imager A2 (Zeiss, Oberkochen, Germania). Il principio si basa sull'eccitazione di fluorofori da parte di fasci luminosi a lunghezze d'onda definite, con conseguente emissione di radiazioni a lunghezza d'onda maggiore, rilevabili dal microscopio. Le acquisizioni sono state effettuate con obiettivo 10 e 40X e le immagini visualizzate mediante il software ZEN Blue (Zeiss). L'analisi di colocalizzazione tra il segnale di YFP e VGAT è stata effettuata mediante il software Image J (ImageJ, NIH) utilizzando la funzione Colocalization Test. Sono stati analizzati 3 campioni per condizione e il risultato è riportato come media ± SD mediante il software GraphPad Prism (GraphPad, Boston, MA, Stati Uniti). Per definire la significatività statistica è stato usato un t-test e sono stati ritenuti significativi tutti i risultati con $P<0.05$.

2.4 PROTOCOLLO DI DISSEZIONE E PREPARAZIONE DELLE FETTINE DI MIDOLLO SPINALE

Al fine di studiare la trasmissione sinaptica nelle corna dorsali del midollo spinale si è reso necessario il prelievo del midollo spinale dai topi oggetto dello studio. Il taglio delle fettine al vibratomo e le registrazioni di Patch-Clamp devono avvenire nel giro poche ore affinché i risultati delle registrazioni stesse non vengano compromesse dai danni cellulari delle sezioni di midollo.

Prima di cominciare l'esperimento è necessario preparare con anticipo tre diverse soluzioni: la soluzione di Krebs per la dissezione, la soluzione di Krebs per l'incubazione e la soluzione di Krebs per la registrazione.

La prima viene utilizzata nella prima fase dell'esperimento. È una soluzione *'high-sucrose'*, a un più basso contenuto di cloruro di sodio rispetto alla soluzione di Krebs per l'incubazione; nella sua composizione vi sono alte concentrazioni di Mg^{+2} e basse concentrazioni di Ca^{+2} che evitano fenomeni

di eccitotossicità bloccando i recettori per il glutammato di tipo NMDA e quindi l'ingresso di calcio all'interno della cellula. La soluzione contiene, inoltre, acido chinurenico (1mM), che agisce come modulatore del SNC bloccando i recettori NMDA e AMPA.

È importante che la temperatura della soluzione sia ~ 0-2°C per ridurre il metabolismo cellulare e il consumo di ossigeno e per favorire il successivo taglio delle sezioni; per questo, una volta pronta viene conservata a -20°C finché non raggiunge la temperatura idonea (Bardoni, 2022).

Tabella 4: Componenti della soluzione di Krebs di dissezione

Componenti	Concentrazione (mM)
NaCl	95
KCl	2.5
Saccarosio	50
NaH_2PO_4	1.25
$NaHCO_3$	26
Glucosio	25
$MgCl_2$	6
$CaCl_2$	1.5
Acido Chinurenico	1

A questo punto si procede con il sacrificio, per decapitazione, dell'animale precedentemente anestetizzato per via inalatoria con Isoflurano. Prima di procedere al sacrificio, si accerta l'assenza di riflessi spinali.

L'animale viene posto in posizione prona e viene attentamente eseguito un taglio sul lato dorsale in direzione rostro-caudale, per permettere di isolare la colonna vertebrale. Questa viene successivamente posta nella camera di dissezione riempita con la soluzione di Krebs per la dissezione, gorgogliata con il gas carbossigeno (95% O_2, 5% CO_2).

Si procede, quindi, all'estrazione del midollo spinale eseguendo una laminectomia ventrale. Prima di rimuovere le meningi, nella regione ventrale e poi in quella dorsale, si rimuovono le radici ventrali e si isolano quelle dorsali che una volta asciugate con della carta assorbente vengono poste alla base di uno stampo in cui verrà versata la soluzione di agarosio (Low melting point agarose 3%, sciolto in soluzione di Krebs di incubazione). Il blocchetto contenente il midollo una volta solidificato viene estratto dallo stampo e incollato sulla piattaforma di taglio del vibratomo con la porzione dorsale

rivolta verso la lama. Il vibratomo viene impostato alla velocità minima ma alla massima frequenza di vibrazione (9-10) per ottenere delle fettine in sezione trasversale, dallo spessore di circa 400µm. Con l'aiuto di una pipetta Pasteur le fettine vengono trasferite su una retina all'interno di un becher contenente la soluzione di Krebs di incubazione gorgogliata con carbossigeno per circa 20 minuti a 32°C e poi a temperatura ambiente. Le sezioni di midollo possono essere utilizzate a questo punto per le registrazioni di Patch-Clamp per le 5-6h successive all'esperimento (Bardoni, 2022).

Tabella 5: Componenti della soluzione di Krebs di incubazione

Componenti	Concentrazione (mM)
NaCl	125
KCl	2.5
NaH_2PO_4	1.25
$NaHCO_3$	26
Glucosio	25
$MgCl_2$	6
$CaCl_2$	1

2.5 LA TECNICA DEL PATCH-CLAMP

La tecnica del Patch-Clamp ha rappresentato sin dal suo sviluppo il *'gold standard'* per analisi su cellule eccitabili e non eccitabili. Ha, infatti, contribuito ampiamente allo studio di diversi tipi cellulari: cellule muscolari, cardiomiociti, canali ionici e rispettivi recettori ma, soprattutto, cellule neuronali.

Questa tecnica segue i principi delle leggi di Ohm e consente non solo delle misurazioni precise dei patterns eccitatori ma anche delle valutazioni circa la conduttanza ionica dei canali stessi.

Nel corso del tempo ha subito diverse modifiche la più recente delle quali ha introdotto un sistema automatizzato che consente registrazioni simultanee, sia in voltage- che current-clamp, in cellule prelevate dai tessuti nativi (Ghovanloo et al., 2025).

Nei primi anni del '900 J. Bernstein fu il primo ad ipotizzare che gli impulsi nervosi fossero una variazione transiente della resistenza della membrana in cui il picco del potenziale d'azione corrispondeva al minimo di tale resistenza. Questa teoria ha dato inizio a tutta una serie di studi successivi fino al 1970, anno in cui B. Sakmann e E. Neher riportarono le prime registrazioni *'single-channel'* di Patch-Clamp.

2.5.1 PATCH-CLAMP: Le basi della tecnica

È una tecnica formulata sulle leggi di Ohm che descrivono la relazione tra voltaggio (V), corrente (I) e resistenza (R) e per le quali V=IR.

Nel contesto elettrofisiologico il voltaggio (V) rappresenta il potenziale di membrana che controlla il gating dei canali voltaggio-dipendenti, la corrente (I) è la corrente ionica che fluisce attraverso i canali ionici ed infine, la resistenza (R) che indica lo stato di tali canali. Questa tecnica consente, quindi, di regolare ciascuna di queste tre variabili.

Il principio su cui si basa il Patch-Clamp è un flusso di corrente che fluisce all'interno di un elettrodo dentro a una micropipetta di vetro dalla punta estremamente sottile mantenendo il voltaggio al quale l'elettrodo è settato. Quando l'elettrodo entra in contatto con una piccola porzione della membrana cellulare, viene registrato un segnale poi captato da un amplificatore che filtra il segnale stesso.

Questa tecnica, a seconda del tipo di esperimento, può essere impiegata in diverse conformazioni ognuna delle quali ha punti di forza ma anche criticità.

Il primo tipo di conformazione è definito *'cell-attached'* in cui l'elettrodo riempito con una soluzione intracellulare aderisce fortemente alla membrana cellulare. Nella conformazione *'inside-out'* l'elettrodo compie un movimento tale per cui un pezzetto di membrana cellulare con il relativo canale ionico di interesse viene rotto. Terzo assetto è l'*'outside-out'* ottenuto allontanando l'elettrodo dalla membrana cellulare.

Dalla conformazione cell-attached si passa alla '*whole-cell'* ottenuta con un leggero movimento di aspirazione esercitato dall'elettrodo stabilendo una "connessione" tra la superficie della membrana cellulare e la punta dell'elettrodo.

In questa conformazione vi è non solo accesso al versante intracellulare ma è possibile misurare i potenziali elettrici e le correnti dell'intera cellula.

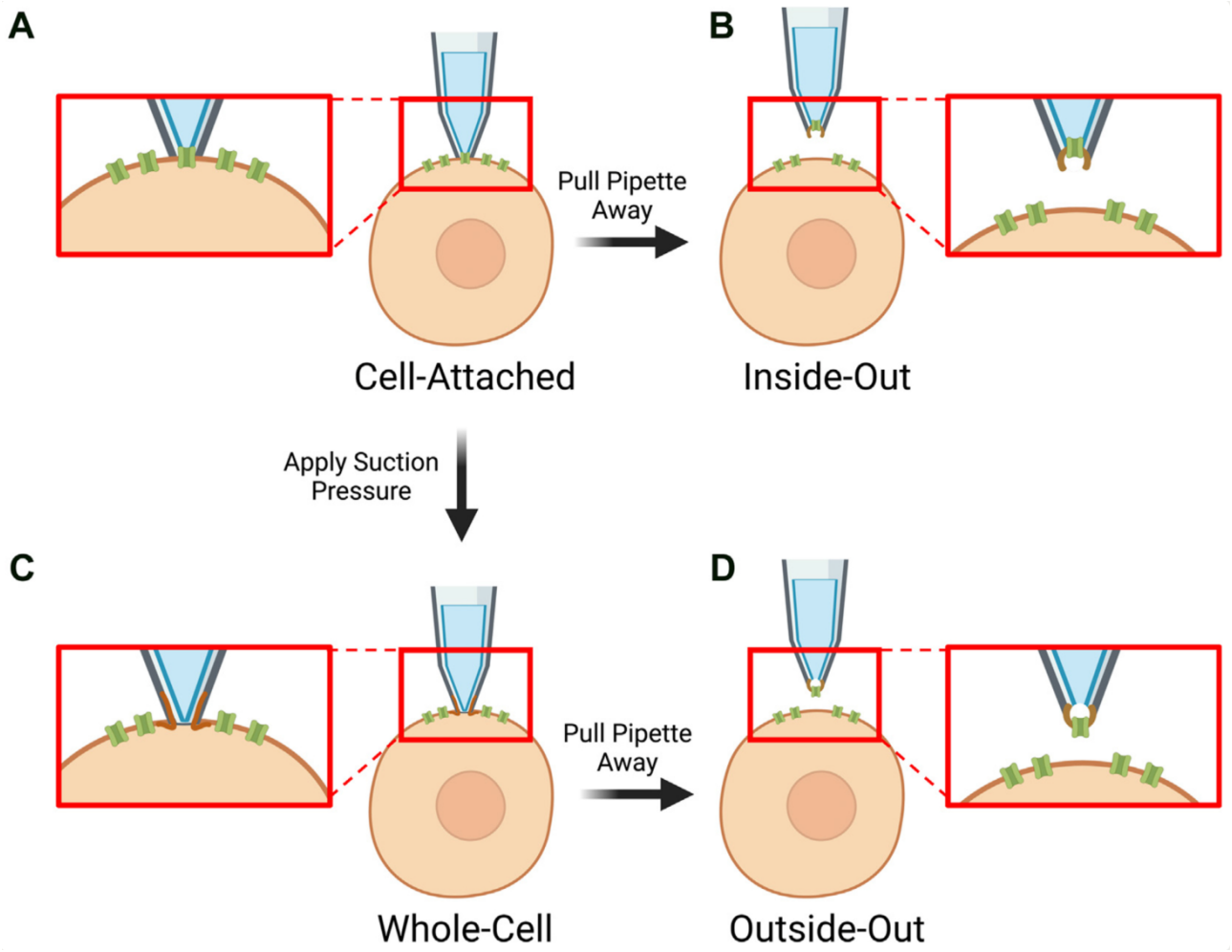


Figura 4. ***A, B, C, D*** *Rappresentazione schematica delle diverse configurazioni tipiche del Patch-Clamp (Ghovanloo et al., 2025).*

Più nello specifico, nella whole-cell gli elettrodi di vetro hanno una punta sì sottile ma smussata e questo gli permette, quando premuti delicatamente sulla membrana cellulare, di isolare uno o pochi canali nella membrana. Al momento del contatto, tra la membrana e l'elettrodo si stabilisce un *'seal'* cioè una sorta di sigillo ad alta resistenza nell'ordine dei GΩ.

Il Patch-Clamp è un'applicazione del *voltage-clamp* nel quale lo sperimentatore può controllare il potenziale di membrana tenendolo fisso a un valore preimpostato che corrisponde circa al potenziale di riposo (V_m = Potenziale di Holding). Questa tecnica inizialmente sfruttava due elettrodi di cui uno necessario a misurare il potenziale di membrana e l'altro per iniettare la corrente elettrica necessaria a bloccare il potenziale al valore scelto. Il principio base, quindi, è che le correnti applicate devono essere uguali ma di carica opposta alla corrente che attraversa la membrana cellulare (a V_m desiderato); pertanto, le correnti misurate istante per istante indicano come la cellula (o il canale ionico) reagisce ai cambiamenti di potenziale di membrana (Ghovanloo et al., 2025).

Esperimenti di voltage-clamp vengono, per esempio, condotti per investigare la cinetica dei canali ionici in risposta a degli agenti farmacologici che ne modulano l'attività.
Nel caso di registrazioni in *current-clamp* lo sperimentatore può, invece, impostare la quantità di corrente da iniettare con un elettrodo e andare poi a misurare le variazioni del potenziale di membrana nel tempo. È la tecnica migliore per la registrazione dei potenziali post-sinaptici, sia eccitatori che inibitori. Nel caso degli EPSP si registrano le depolarizzazioni della membrana (ci si sposta verso valori di potenziale più positivi) dovute all'apertura di canali ionici ligando-dipendenti permeabili a sodio o potassio. Nel caso, invece, di IPSP, si misurano iperpolarizzazioni della membrana (valori di potenziale più negativi). Gli esperimenti di current-clamp, invece, si sono rivelati particolarmente significativi quando includono cellule eccitatorie che originano dei potenziali d'azione come per esempio i neuroni. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che sostituzioni amminoacidiche in canali ionici, possano portare a ipereccitabilità neuronale con conseguenti disturbi legati al dolore.

2.5.2 PATCH-CLAMP: la strumentazione per le registrazioni

Il sistema impiegato per le registrazioni è composto da un amplificatore, un computer, un'interfaccia analogico-digitale, un micromanipolatore, un microscopio e una gabbia di Faraday con il relativo sistema di perfusione.
Per la rilevazione dell'attività elettrica si sfrutta un elettrodo, la cui resistenza si aggira tra i 3-5MΩ, all'interno del quale è presente una soluzione dentro la quale verrà immerso un filo d'argento collegato al microscopio. È necessario poi un secondo elettrodo di riferimento o di "terra" costituito anch'esso da un filo d'argento che viene posto nella cameretta di perfusione. Entrambi sono collegati all'headstage dell'amplificatore che registra i segnali e li trasmette al computer. Al sistema è collegato anche un monitor attraverso il quale visualizzare più agevolmente le cellule rispetto all'impiego del solo microscopio a luce polarizzata (Gandini et al., 2014).
Per avvicinare l'elettrodo alla cellula vanno compiuti dei movimenti microscopici con il micromanipolatore al fine di non rompere la punta dell'elettrodo o per non rovinare il preparato.

2.5.3 PATCH-CLAMP: Le registrazioni

Le registrazioni mediante Patch-Clamp nella conformazione whole-cell sono state eseguite sulle lamine I e II delle corna dorsali del midollo spinale a temperatura ambiente.
Le fettine di midollo spinale venivano perfuse con la soluzione di Krebs per la registrazione, ad un flusso di 2ml/min (Bardoni, 2022).

Tabella 6: Componenti della soluzione di Krebs di registrazione

Componenti	Concentrazione (mM)
NaCl	125
KCl	2.5
NaH_2PO_4	1.25
$NaHCO_3$	26
Glucosio	25
$MgCl_2$	1
$CaCl_2$	2

Questa soluzione veniva preparata, come le altre, il giorno stesso dell'esperimento. I sali in essa contenuti concorrono a creare una soluzione bilanciata che simula la composizione dei fluidi corporei extracellulari. In particolare, NaH_2PO_4 e $NaHCO_3$, in presenza di CO_2, agiscono come sistema tampone per mantenere il pH della soluzione a 7.4.

Le registrazioni in current- e voltage-clamp delle correnti inibitorie post-sinaptiche, evocate da stimolazione optogenetica (oIPSCs), sono state compiute utilizzando una soluzione intracellulare a base di potassio con la seguente composizione:

Tabella 7: Composizione della soluzione intracellulare per le registrazioni di oIPSCs

Componenti	Concentrazione (mM)
CH_3KO_3S (metansulfonato di potassio)	120
NaCl	10
EGTA	10
HEPES	10
ATP-Mg	5
GTP-Na	0.5
$CaCl_2$	1

La soluzione, inserita all'interno dell'elettrodo di registrazione, veniva portata a pH a 7.2 tramite l'aggiunta di KOH. L'osmolarità era intorno a 300 mOsm.

I dati sono stati registrati e acquisiti mediante un amplificatore MultiClamp 700A, un convertitore di segnale (da analogico a digitale) Digidata 1550 e un software 'pClamp 10, programma Clampex' (Molecular Devices, USA). La frequenza di campionamento è stata impostata a 10KHz e i segnali venivano filtrati a 2Hz.

Le registrazioni in modalità di current-clamp sono state svolte all'inizio degli esperimenti. Nei primi 5 minuti di registrazione è stato valutato il potenziale di riposo delle cellule e quelle per le quali il potenziale di membrana risultava al di sopra dei -50mV sono state scartate.
La capacità cellulare di generare impulsi elettrici è stata invece valutata applicando corrente in diversi step depolarizzanti. Tra uno step e l'altro il potenziale di membrana del neurone veniva mantenuto intorno a -80mV o a -60mV.
Per quanto riguarda le correnti post-sinaptiche inibitorie sono state registrate in modalità voltage-clamp ad un potenziale di -30mV per ridurre al minimo le correnti di potassio che tenderebbero ad attivarsi a valori di potenziali di membrana più positivi (Salio et al., 2025).
Gli esperimenti di elettrofisiologia sono stati condotti su 39 animali, di cui 25 maschi e 14 femmine. Per quanto concerne l'analisi dei dati, è stata effettuata su 84 neuroni delle lamine I e II del midollo spinale. I gruppi sono stati confrontati con un paired t-test mentre per i dati che non seguivano una distribuzione normale sono stati usati test non-parametrici. Per l'analisi statistica è stato usato il software GraphPad Prism 7.

2.6 ATTIVAZIONE DEL CANALE ChR2 MEDIANTE STIMOLAZIONE OTTICA

L'attivazione del canale ChR2 (ChannelRhodopsin 2) nel midollo spinale dei topi VGAT-ChR2-eEYFP è stata prodotta, negli interneuroni inibitori, da stimoli di luce blu a 470nm della durata di 500ms ad intervalli di 20s. Gli impulsi sono stati generati da un LED a 470nm, controllato dal modulo BioLED (mightex, USA). La luce veniva applicata ad un'intensità variabile tra il 50 e il 90% rispetto all'intensità massima.
Le correnti inibitorie post-sinaptiche (oIPSC) sono state evocate ad un'intensità luminosa necessaria a produrre una corrente della massima ampiezza con un impulso luminoso di circa 10ms ogni 20s.

RISULTATI

Nel modello animale B6.Cg-Tg da noi studiato (topi "VGAT-ChR2-EYFP"), la EYFP è stata sfruttata nella genotipizzazione come discriminante tra gli animali transgenici e quelli WT.

Quello che abbiamo riscontrato, in accordo con il protocollo standard di PCR dei 'Jackson Laboratory' su tale linea (#:014548), è che in tutti gli animali transgenici è possibile osservare due bande: una di controllo a ~200 paia di basi e quella del transgene a ~400 paia di basi. Negli animali WT, al contrario, osserviamo una singola banda a ~200 paia di basi (Figura 5).

Lo scopo ultimo era la selezione dei soli animali transgenici per il corretto proseguimento dello studio.

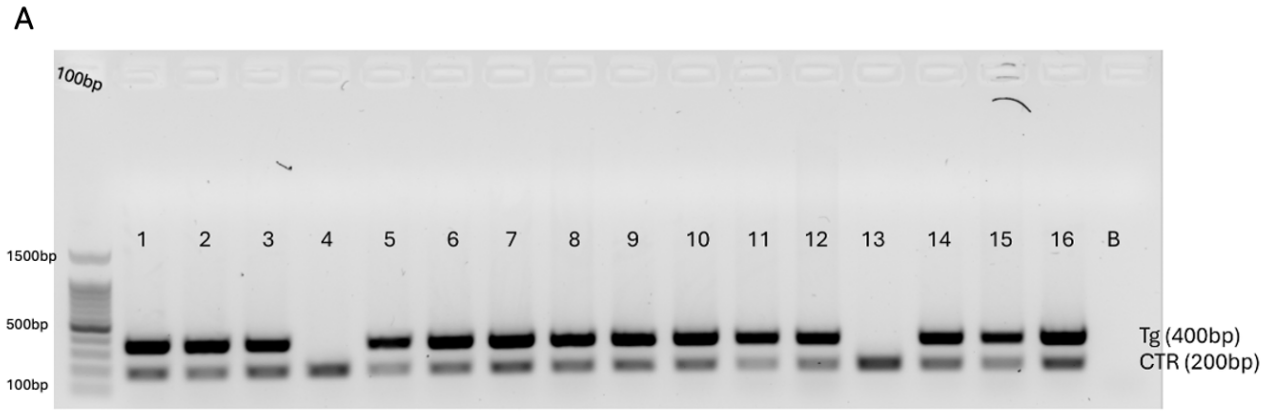


Figura 5. A. *Corsa elettroforetica su un totale di 16 campioni: si osservano due bande per gli animali transgenici e una per i WT.*

Le registrazioni di Patch-Clamp sui topi VGAT-ChR2-EYFP sono state eseguite sui neuroni delle lamine I e II in fettine di midollo spinale. Lo scopo era di visualizzare le correnti generate da stimolazione optogenetica e di caratterizzare, sulla base delle proprietà elettrofisiologiche, gli interneuroni inibitori da quelli eccitatori (Figura 6.1 A).

La stimolazione ottica delle sezioni di midollo di tale modello animale ha evocato delle correnti che sono state registrate in modalità voltage-clamp settando il potenziale di membrana a -70mV.

In tali condizioni, ciò che ci ha permesso di identificare i neuroni VGAT+ (Figura 6.1 B) è stata la corrente generata dai canali Channel-Rhodopsin2 la quale, mediata da ioni positivi, mostra un picco iniziale rivolto verso il basso (corrente inward) seguito dal tipico plateau. Sovrapposte a questa corrente si possono a volte individuare anche correnti sinaptiche inibitorie evocate dalla stimolazione ottica.

Nei neuroni VGAT- (Figura 6.1 C), che non esprimono il canale Channel-Rhodopsin2, la stimolazione optogenetica allo stesso potenziale di membrana di -70mV ha come effetto solo la generazione di una corrente post-sinaptica inibitoria (oIPSC).

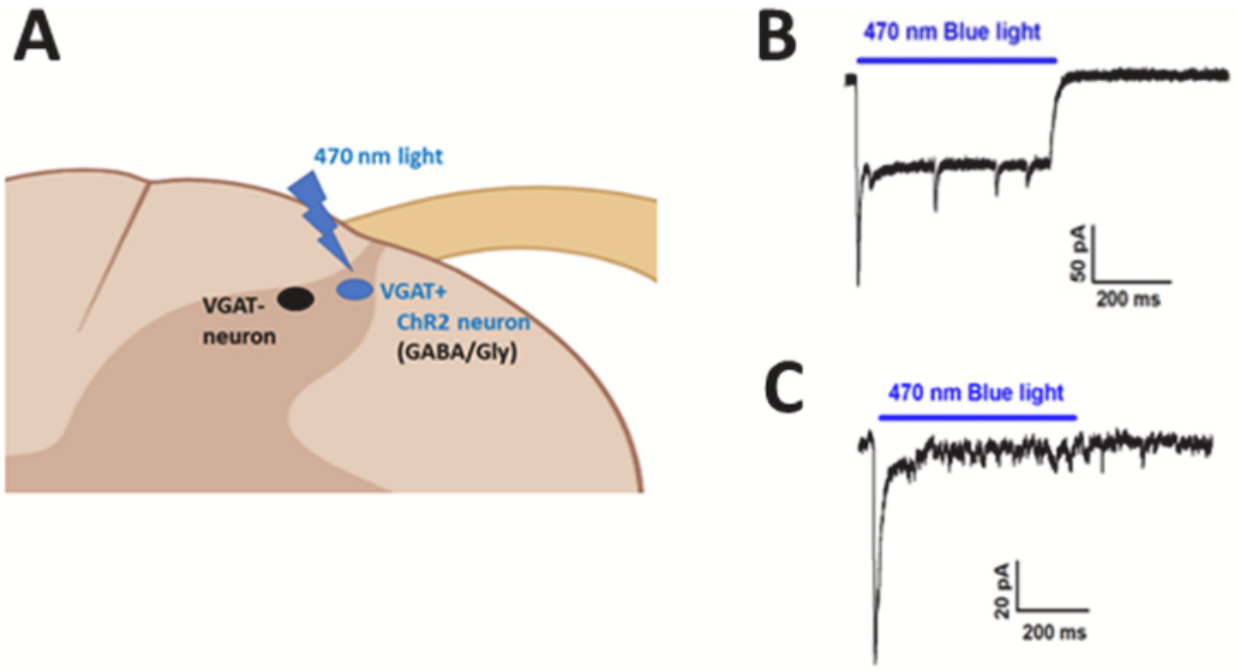


Figura 6.1 *Stimolazione optogenetica del neuroni delle lamine I e II* ***A.*** *Attivazione degli interneuroni inibitori VGAT+/ChR2 con un impulso luminoso di luce blu a 470 nm.* ***B.*** *Corrente mediata dalla ChR2 registrata in voltage-clamp a -70mV nei neuroni VGAT+* ***C.*** *Nei VGAT- la stimolazione ottica a 470 nm genera solo una corrente post-sinaptica inibitoria (oIPSC).*

Abbiamo quindi caratterizzato i pattern di scarica dei potenziali d'azione dei neuroni VGAT+ e VGAT-. Abbiamo compiuto registrazioni in current-clamp partendo da un potenziale di membrana iniziale di -80 o -60mV (Figura 6.2 A). Negli interneuroni inibitori VGAT+, ad entrambi i potenziali, si osserva prevalentemente un firing tonico, ossia una modalità di scarica di potenziale d'azione che è continua e regolare per tutto il perdurare dello stimolo.

Di contro, i putativi interneuroni eccitatori VGAT- hanno mostrato un tipo di firing delayed (ritardato) nel quale la scarica di potenziale d'azione parte con un certo ritardo rispetto allo stimolo e che risulta essere più accentuato ad un potenziale di -80mV. Questo pattern è dovuto all'attivazione di correnti di potassio uscenti (I_A) che risultano più efficaci a potenziali iperpolarizzanti (-80mV).

Come mostrato in figura (6.2 B) nei grafici a torta è possibile distinguere, ai potenziali di membrana imposti, i diversi pattern di scarica espressi in percentuale, a -60 e -80mV.

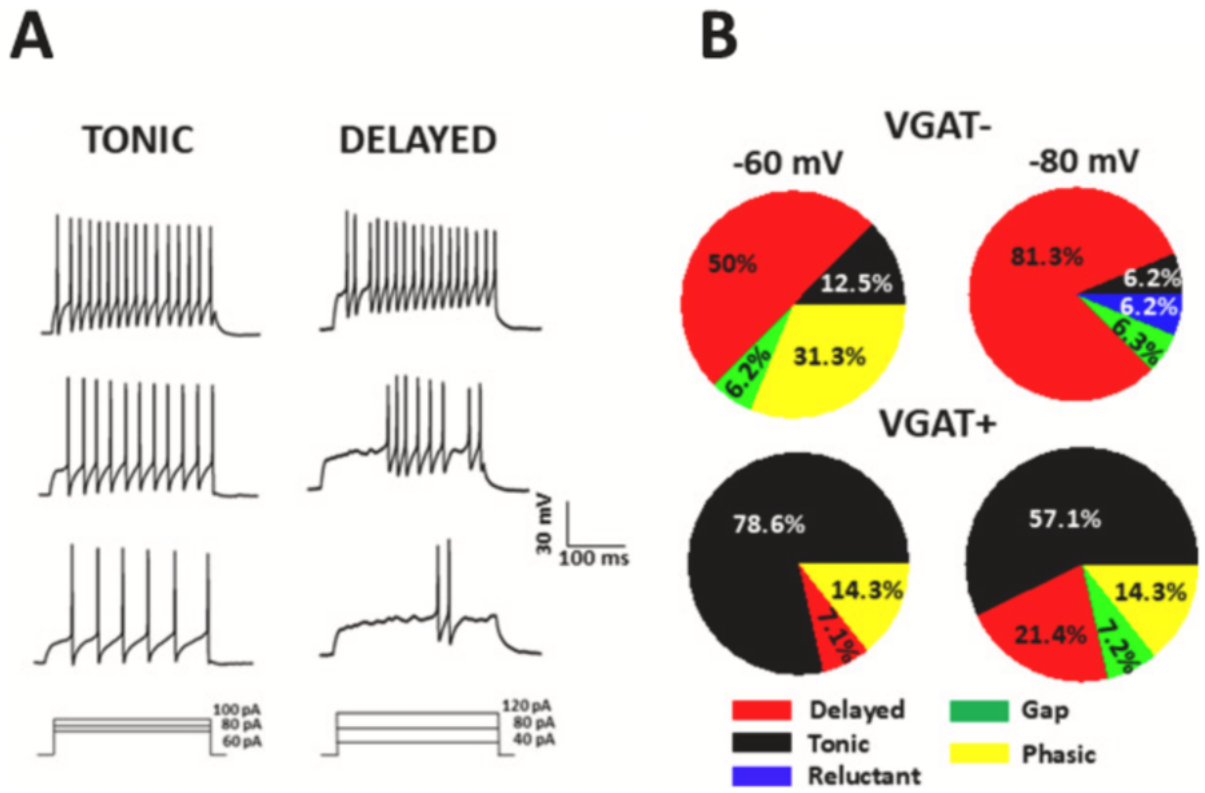


Figura 6.2 *Proprietà elettrofisiologiche e pattern di scarica dei potenziali d'azione.* ***A.*** *Esempio di attivazione tonica e delayed dei potenziali d'azione a -60mV e -80mV.* ***B.*** *Rappresentazione in percentuale dei diversi tipi di attivazione del potenziale d'azione nelle due popolazioni neuronali d'interesse (n=14, VGAT+; n=16, VGAT-).*

Infine, abbiamo studiato la composizione delle correnti post-sinaptiche inibitorie evocate dalla stimolazione ottica (oIPSC), per chiarire il ruolo dei neurotrasmettitori inibitori, GABA e glicina, nell'inibizione sinaptica dei neuroni VGAT+ e VGAT-. A tal fine, abbiamo registrato una serie di oIPSC ad un potenziale di membrana di -30mV in modalità voltage-clamp.

Ad un potenziale di membrana più positivo del potenziale di equilibrio del cloro (che si assestava intorno a -60mV nelle nostre condizioni sperimentali), il legame di GABA e glicina ai rispettivi recettori provoca l'ingresso di Cl- all'interno della cellula, visibile come una corrente verso l'alto (outward).

Per dimostrare che tali oIPSC fossero mediate da GABA e glicina abbiamo utilizzato gli antagonisti dei recettori $GABA_A$ (bicucullina,10µM) e dei recettori per la glicina (stricnina, 1µM), aggiunti alla perfusione. La somministrazione di entrambi gli antagonisti ha provocato un blocco completo delle oIPSC, confermando che erano mediate da GABA e glicina (Figura 7.1, tracce blu).

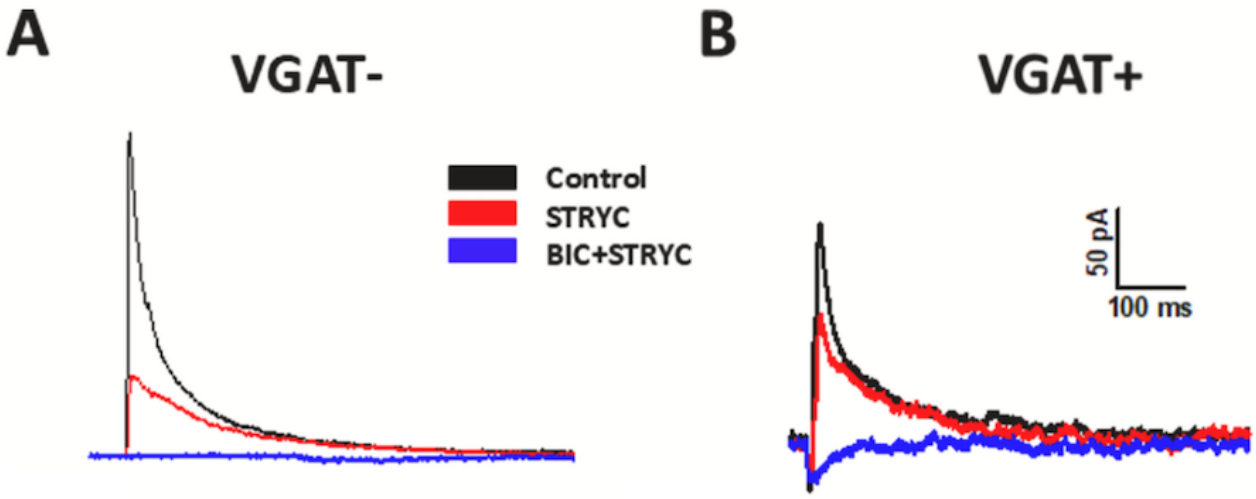


Figura 7.1 A-B. *Registrazioni di correnti post-sinaptiche inibitorie (oIPSC) nei neuroni VGAT+ e VGAT- a -30mV in presenza degli antagonisti bicucullina e stricnina.*

Nella valutazione delle singole componenti GABAergiche e glicinergiche, nelle correnti post-sinaptiche inibitorie otticamente evocate, registrate dai neuroni VGAT+, non si sono trovate delle differenze statisticamente significative tra la componente GABAergica e glicinergica che mostrano delle ampiezze piuttosto simili (Figura 7.2 B e 7.2 C).

Al contrario, nei neuroni VGAT- la componente glicinergica risulta essere significativamente preponderante se comparata a quella GABAergica. Negli interneuroni eccitatori VGAT- delle lamine I e II, sorprendentemente, sembra essere la glicina ad agire come principale neurotrasmettitore che agisce come 'gate' per evitare che ci sia un'anomala trasmissione del dolore ai centri superiori (Figura 7.2 A e 7.2 C).

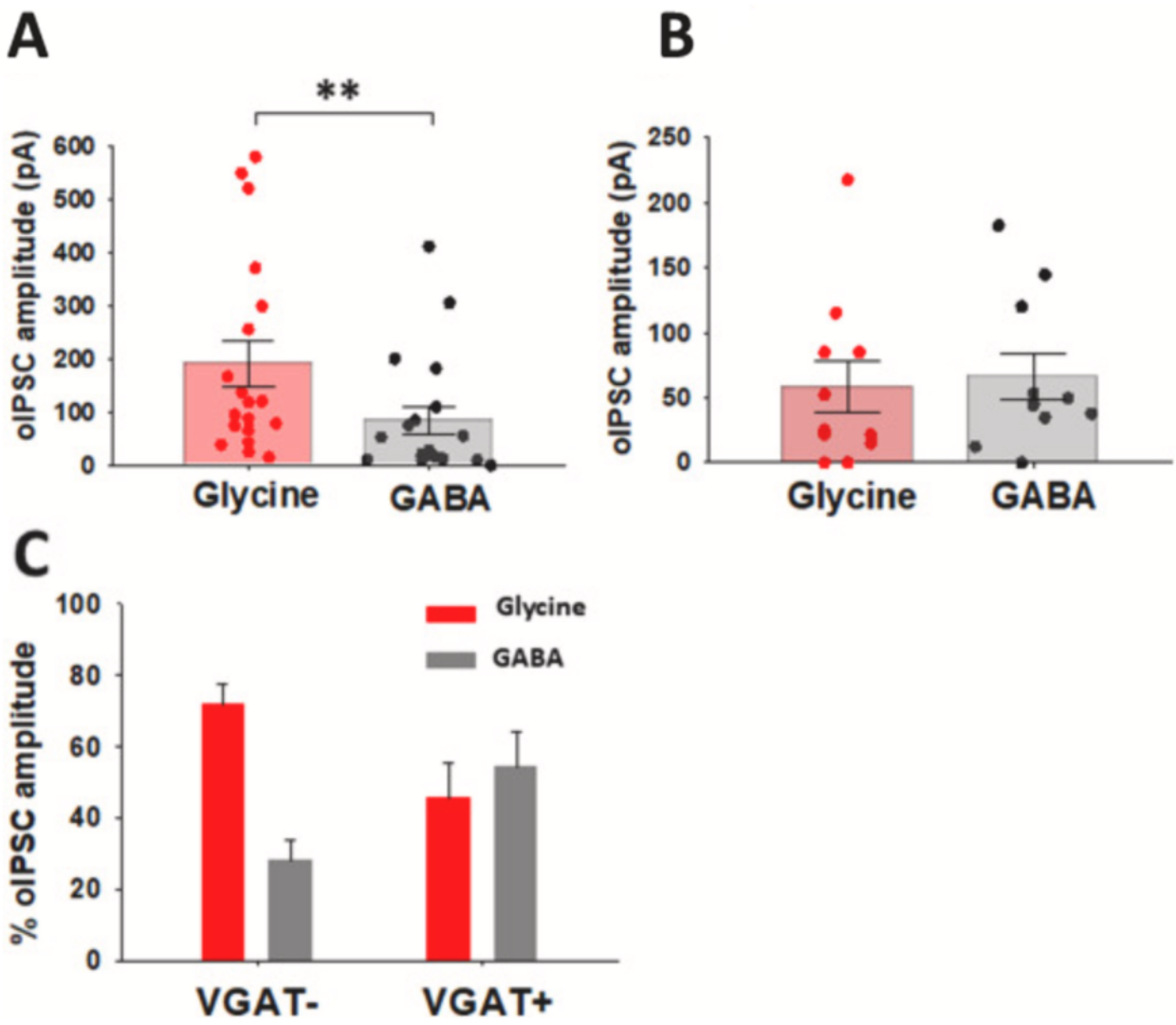


Figura 7.2 A-C. *Rappresentazione grafica dei singoli contributi di GABA e glicina nei potenziali post-sinaptici inibitori otticamente evocati nei neuroni VGAT+ e VGAT- (VGAT-: **P < 0.01, paired t-test, n = 19; VGAT+: P > 0.05, paired t-test, n = 11).*

Il trasportatore vescicolare di GABA e glicina, VGAT, è responsabile del trasporto di tali neurotrasmettitori inibitori all'interno delle vescicole sinaptiche prima che avvenga il loro rilascio.
Poiché il centro di snodo dell'informazione dolorifica risiede nelle lamine più superficiali del midollo spinale, con la marcatura anticorpale di VGAT e EYFP (rispettivamente in rosso e in verde) ne abbiamo voluto osservare l'effettiva distribuzione.
Com'è possibile osservare in figura 8 A-D, la colorazione dei nuclei cellulari con il DAPI evidenzia l'organizzazione laminare del midollo stesso. Con un maggiore focus sulle lamine I e II, la prima appare distinguibile per la presenza di corpi cellulari di dimensioni differenti mentre la seconda per la presenza di corpi cellulari di più piccole dimensioni densamente compattati.
Per quanto concerne l'espressione di VGAT, nei campioni trattati rispetto al campione di controllo (Figura 8B e 8D), al quale non è stata aggiunta la soluzione di anticorpi primari, risulta distribuito in tutto il midollo spinale ma con una maggiore concentrazione proprio nelle lamine I e II nelle quali si osserva uno staining puntiforme dato dalla localizzazione di VGAT non all'interno di tutto il soma cellulare bensì nelle vescicole sinaptiche concentrate nei terminali assonali.
Per dare rilievo ai nostri risultati abbiamo condotto un'analisi di co-localizzazione tra il segnale di VGAT ed EYFP confrontando, il segnale stesso, sia all'interno di un controllo che in VGAT+. La colocalizzazione dei segnali nei VGAT+ è di 0.710, un valore significativamente maggiore rispetto allo 0.406 ottenuto nel controllo. Tale risultato è fortemente indicativo della presenza, all'interno degli interneuroni VGAT+, non solo della EYFP ma anche della ChR2 motivo per il quale, tale modello animale è idoneo per gli esperimenti di optogenetica.
Infine, abbiamo attribuito una significatività statistica ai nostri dati mediante un t-test ritenendo significativi solo i risultati per i quali il P-value<0.05 (Figura 8E).

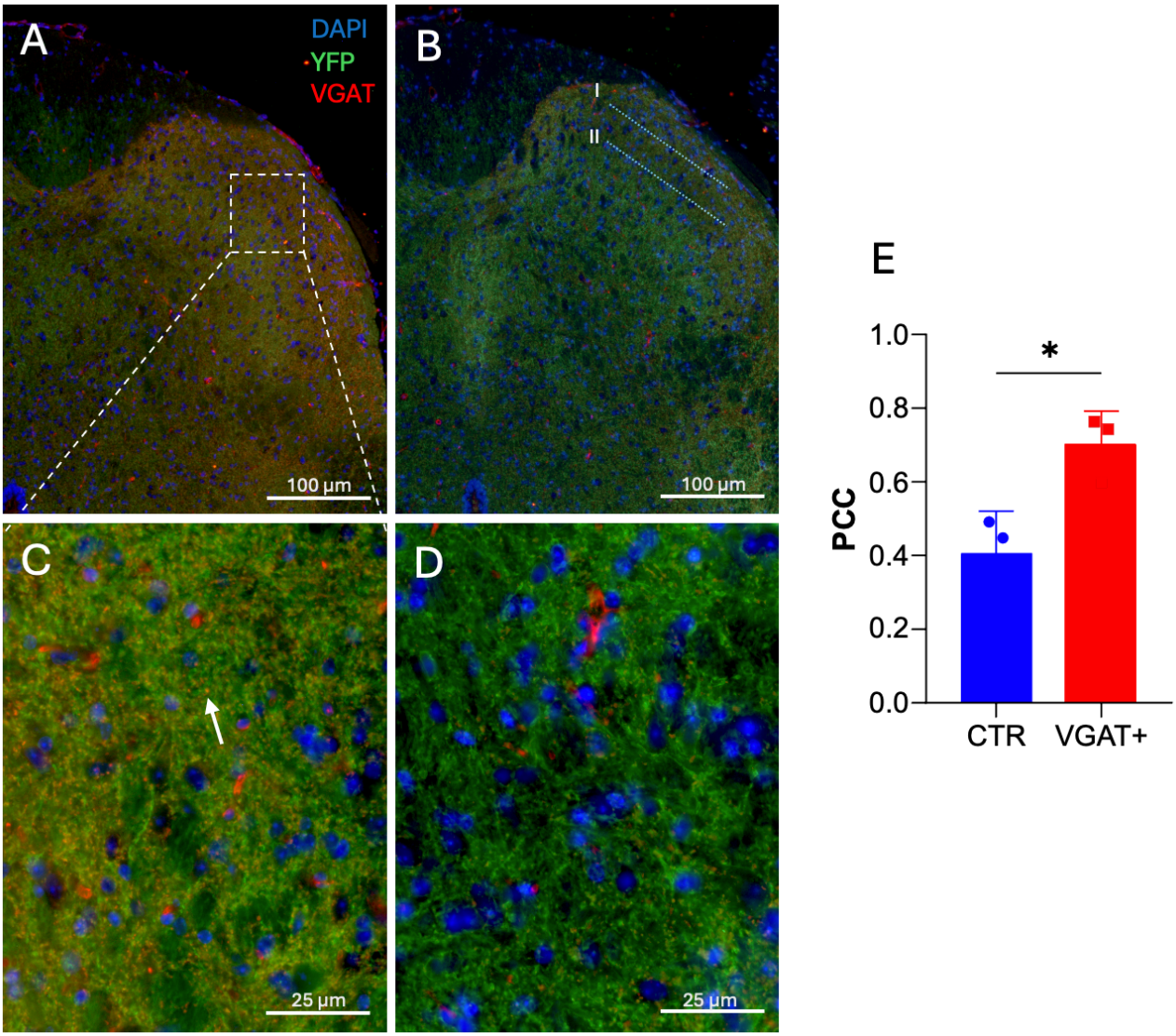


Figura 8. A e C. *Ingrandimento 10X e 40X dei campioni marcati con Alexa Fluor 568 (VGAT) e Alexa Fluor 488 (EYFP). Lo staining di VGAT (in rosso) è puntiforme, mentre YFP (in verde) è diffusa in tutto il corpo cellulare dei neuroni. La marcatura in giallo mostra la colocalizzazione dei due segnali.* ***B e D.*** *Ingrandimento a 10X e 40X del campione di controllo VGAT-.* ***E.*** *Pearson Correlation sui campioni VGAT+ e relativi controlli (T-test parametrico, *p-value=0,0253).*

CONCLUSIONI

Lo studio da noi condotto ha voluto esplorare i circuiti neuronali delle corna dorsali del midollo spinale coinvolti nella modulazione del dolore affinché si aprissero nuovi orizzonti terapeutici nei casi di dolore cronico.
Le informazioni somatosensoriali nocicettive giungono, attraverso le fibre afferenti primarie, nelle lamine di Rexed più superficiali, lamine I e II, che rappresentano il principale centro di snodo dell'informazione dolorifica che deve essere finemente regolata da un costante equilibrio tra uno stato inibitorio ed eccitatorio, per evitare un'aberrante attivazione della via stessa.

Poiché il nostro obiettivo era principalmente quello di caratterizzare il pattern inibitorio di tale via e data la straordinaria complessità cellulare che caratterizza le lamine delle corna dorsali, ci siamo serviti di un modello transgenico che ci consentisse in primo luogo di discriminare tra le due classi neuronali in esse predominanti, interneuroni inibitori ed eccitatori. Il modello animale VGAT-ChR2-EYFP esprime, infatti, la ChR2 e la EYFP sotto il controllo del promotore di VGAT, altamente specifico per i neuroni GABAergici e glicinergici e perciò inibitori.

La presenza del canale ChannelRhodopsin2 è stata da noi utilizzata per condurre esperimenti di optogenetica su sezioni di midollo spinale. L'applicazione dello stimolo di luce blu a 470nm ci ha consentito di osservare le correnti generate dalla ChannelRhodopsin2 all'interno della popolazione neuronale VGAT+. Nella popolazione neuronale VGAT-, invece, la stimolazione luminosa ha evocato solo correnti post-sinaptiche inibitorie (oIPSCs), mediate da GABA e glicina. Il blocco totale di tali correnti, ottenuto usando gli antagonisti bicucullina e stricnina, ha confermato che l'espressione del canale ChR2 fosse selettiva negli interneuroni inibitori di interesse e non fosse presente nei putativi interneuroni eccitatori (VGAT-).
I risultati da noi ottenuti, confermati dai dati di immunoistochimica, mostrano quindi come i topi VGAT-ChR2-EYFP rappresentino un modello animale idoneo all'attivazione selettiva degli interneuroni inibitori delle corna dorsali, utile per la caratterizzazione funzionale dei circuiti spinali del dolore.

La complessità cellulare a livello delle lamine I e II delle corna dorsali non si manifesta solo a livello morfologico, ma anche e soprattutto per quanto concerne le proprietà elettrofisiologiche delle cellule neuronali stesse. Quindi, il passo successivo del nostro studio è stato quello di caratterizzare, nelle due popolazioni neuronali in esame (VGAT+ e VGAT-), i diversi pattern di scarica di potenziali d'azione in risposta a correnti depolarizzanti, registrando in modalità current-clamp e mantenendo il potenziale di membrana a -60 e -80mV. Nelle nostre condizioni di registrazione, abbiamo potuto

constatare che i neuroni VGAT+ (inibitori) mostrano un tipo di firing tonico ad entrambi i potenziali. I neuroni VGAT- (eccitatori) mostrano, invece, un tipo di firing delayed più accentuato ad un potenziale iperpolarizzante di -80mV, al quale risultano più evidenti le correnti di potassio uscenti (I_A). Questi risultati sono in accordo con quanto mostrato in studi precedenti e confermano come i neuroni inibitori possiedano una maggior eccitabilità rispetto a quelli eccitatori (Rivera-Arconada et al., 2025).

Si è sempre ritenuto che il neurotrasmettitore inibitorio per eccellenza nelle lamine più superficiali delle corna dorsali fosse il GABA, rilasciato da solo o insieme alla glicina (Miranda et al., 2022). Studi più recenti hanno invece fatto emergere l'esistenza di neuroni puramente glicinergici non solo nelle lamine III e IV delle corna dorsali ma anche in quelle più superficiali, I e II e che, molti tra questi, esprimono alcuni dei marker già descritti sopra tra cui parvalbumina o l'ossido nitrico sintasi neuronale (nNOS) (Miranda et al., 2022) .
Sulla base di queste osservazioni, abbiamo cercato di comprendere quale fosse la differenza tra interneuroni VGAT+ e VGAT- nel mediare l'inibizione sinaptica, compiendo registrazioni in voltage-clamp ad un potenziale di membrana di -30mV.

Nei neuroni VGAT+ gli oIPSCs evocati hanno mostrato, in accordo con quanto sempre ritenuto, componenti sia GABAergiche che glicinergiche di simili ampiezze. Dall'analisi delle componenti GABAergiche e glicinergiche nei neuroni VGAT- abbiamo invece constatato che i potenziali post-sinaptici inibitori otticamente evocati mostrano una significativa prevalenza glicinergica. Avendo le correnti glicinergiche una cinetica più rapida rispetto a quelle GABAergiche, i nostri dati suggeriscono che, l'inibizione sinaptica sui neuroni eccitatori che trasmettono il dolore, sia più rapida ed efficiente rispetto a quella a carico dei neuroni inibitori. In accordo con i nostri dati, la perdita di inibizione glicinergica sembra sia associata allo sviluppo di dolore neuropatico a seguito di lesioni ai nervi (Salio et al., 2025).

Inoltre, essendo i corpi cellulari dei neuroni puramente glicinergici più abbondanti nelle lamine III e IV delle corna dorsali, è possibile che la stimolazione optogenetica attivi neuroni glicinergici localizzati prevalentemente in lamine profonde, che inviano i loro assoni alle lamine più superficiali. È infine possibile che parte delle risposte sinaptiche inibitorie osservate nei putativi neuroni eccitatori VGAT- siano dovute alla stimolazione di fibre glicinergiche che provengono dai centri sovraspinali quali tronco encefalico, coinvolte nella modulazione discendente del dolore (Salio et al., 2025).

In conclusione, l'impiego di diverse metodologie, tra cui l'elettrofisiologia e l'optogenetica, ci ha consentito di studiare e ampliare le nostre conoscenze riguardo l'organizzazione morfologica e funzionale delle corna dorsali e soprattutto di osservare il contribuito dei trasmettitori GABA e glicina all'inibizione sinaptica a livello delle corna dorsali del midollo spinale. L'auspicio è che le nuove conoscenze acquisite possano fornire nuovi spunti per l'individuazione di bersagli cellulari e molecolari su cui agire nei casi di dolore cronico.

BIBLIOGRAFIA

Abraira, V.E., Ginty, D.D., 2013. The Sensory Neurons of Touch. Neuron 79, 618–639. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.051

Bardoni, R., 2022. Experimental Protocols and Analytical Procedures for Studying Synaptic Transmission in Rodent Spinal Cord Dorsal Horn. Curr. Protoc. 2, e409. https://doi.org/10.1002/cpz1.409

Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. Cell 139, 267–284. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028

Bonin, R.P., De Koninck, Y., 2014. A Spinal Analogue of Memory Reconsolidation Enables Reversal of Hyperalgesia. Nat. Neurosci. 17, 1043–1045. https://doi.org/10.1038/nn.3758

Bonin, R.P., Wang, F., Desrochers-Couture, M., Ga¸secka, A., Boulanger, M.-E., Côté, D.C., De Koninck, Y., 2016. Epidural optogenetics for controlled analgesia. Mol. Pain 12, 1744806916629051. https://doi.org/10.1177/1744806916629051

Boyle, K.A., Gradwell, M.A., Yasaka, T., Dickie, A.C., Polgár, E., Ganley, R.P., Orr, D.P.H., Watanabe, M., Abraira, V.E., Kuehn, E.D., Zimmerman, A.L., Ginty, D.D., Callister, R.J., Graham, B.A., Hughes, D.I., 2019. Defining a Spinal Microcircuit that Gates Myelinated Afferent Input: Implications for Tactile Allodynia. Cell Rep. 28, 526-540.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.040

Browne, T.J., Gradwell, M.A., Iredale, J.A., Madden, J.F., Callister, R.J., Hughes, D.I., Dayas, C.V., Graham, B.A., 2020. Transgenic Cross-Referencing of Inhibitory and Excitatory Interneuron Populations to Dissect Neuronal Heterogeneity in the Dorsal Horn. Front. Mol. Neurosci. 13, 32. https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00032

Chen, J.T., Guo, D., Campanelli, D., Frattini, F., Mayer, F., Zhou, L., Kuner, R., Heppenstall, P.A., Knipper, M., Hu, J., 2014. Presynaptic GABAergic inhibition regulated by BDNF contributes to neuropathic pain induction. Nat. Commun. 5, 5331. https://doi.org/10.1038/ncomms6331

Gandini, M.A., Sandoval, A., Felix, R., 2014. Patch-Clamp Recording of Voltage-Sensitive Ca2+ Channels. Cold Spring Harb. Protoc. 2014, pdb.top066092. https://doi.org/10.1101/pdb.top066092

Ghovanloo, M.-R., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., 2025. The evolution of patch-clamp electrophysiology: Robotic, multiplex, and dynamic. Mol. Pharmacol. 107, 100001. https://doi.org/10.1124/molpharm.124.000954

Harding, E.K., Fung, S.W., Bonin, R.P., 2020. Insights Into Spinal Dorsal Horn Circuit Function and Dysfunction Using Optical Approaches. Front. Neural Circuits 14, 31. https://doi.org/10.3389/fncir.2020.00031

Hughes, D.I., Todd, A.J., 2020. Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord. Neurotherapeutics 17, 874–885. https://doi.org/10.1007/s13311-020-00936-0

Koch, S.C., Acton, D., Goulding, M., 2018. Spinal Circuits for Touch, Pain and Itch. Annu. Rev. Physiol. 80, 189–217. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034303

Lai, H.C., Seal, R.P., Johnson, J.E., 2016. Making sense out of spinal cord somatosensory development. Development 143, 3434–3448. https://doi.org/10.1242/dev.139592

Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. J. Pain Off. J. Am. Pain Soc. 10, 895–926. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.06.012

Lucas-Romero, J., Lopez-Garcia, J.A., Rivera-Arconada, I., 2025. Central terminals of primary afferents coordinate the spontaneous activity of dorsal horn neurons. J. Physiol. 603, 3589–3603. https://doi.org/10.1113/JP287970

Marieb, E.N., Keller, S.M., n.d. Elementi di anatomia e fisiologia dell'uomo.

Miranda, C.O., Hegedüs, K., Wildner, H., Zeilhofer, H.U., Antal, M., 2022. Morphological and neurochemical characterization of glycinergic neurons in laminae I–IV of the mouse spinal dorsal horn. J. Comp. Neurol. 530, 607–626. https://doi.org/10.1002/cne.25232

Moore, K.A., Kohno, T., Karchewski, L.A., Scholz, J., Baba, H., Woolf, C.J., 2002. Partial Peripheral Nerve Injury Promotes a Selective Loss of GABAergic Inhibition in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord. J. Neurosci. 22, 6724–6731. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06724.2002

Peirs, C., Dallel, R., Todd, A.J., 2020. Recent advances in our understanding of the organization of dorsal horn neuron populations and their contribution to cutaneous mechanical allodynia. J. Neural Transm. 127, 505–525. https://doi.org/10.1007/s00702-020-02159-1

Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.-Y., Ribeiro-da-Silva, A., Braz, J.M., Basbaum, A.I., Sharif-Naeini, R., 2015. Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers

of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. Cell Rep. 13, 1246–1257. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.080

Prescott, S.A., Koninck, Y.D., 2002. Four cell types with distinctive membrane properties and morphologies in lamina I of the spinal dorsal horn of the adult rat. J. Physiol. 539, 817–836. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013437

Punnakkal, P., Schoultz, C., Haenraets, K., Wildner, H., Zeilhofer, H.U., 2014. Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn. J. Physiol. 592, 759–776. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.264937

Rivera-Arconada, I., Baccei, M.L., López-García, J.A., Bardoni, R., 2025. An electrophysiologist's guide to dorsal horn excitability and pain. Front. Cell. Neurosci. 19, 1548252. https://doi.org/10.3389/fncel.2025.1548252

Salio, C., Ferrini, F., Bighinati, A., Lacivita, E., Leopoldo, M., Bardoni, R., 2025. Differential synaptic inhibition and serotonin 5-HT7 receptor-mediated modulation in identified dorsal horn neurons. Neurochem. Int. 188, 106011. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2025.106011

Tashima, R., Koga, K., Sekine, M., Kanehisa, K., Kohro, Y., Tominaga, K., Matsushita, K., Tozaki-Saitoh, H., Fukazawa, Y., Inoue, K., Yawo, H., Furue, H., Tsuda, M., 2018. Optogenetic Activation of Non-Nociceptive Aβ Fibers Induces Neuropathic Pain-Like Sensory and Emotional Behaviors after Nerve Injury in Rats. eNeuro 5, ENEURO.0450-17.2018. https://doi.org/10.1523/ENEURO.0450-17.2018

Todd, A., Watt, C., Spike, R., Sieghart, W., 1996. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. J. Neurosci. 16, 974–982. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-00974.1996

Todd, A.J., 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. Nat. Rev. Neurosci. 11, 823–836. https://doi.org/10.1038/nrn2947

Watson, C., Paxinos, G., Kayalioglu, G., Heise, C., 2009. Chapter 16 - Atlas of the Mouse Spinal Cord, in: Watson, C., Paxinos, G., Kayalioglu, G. (Eds.), The Spinal Cord. Academic Press, San Diego, pp. 308–379. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50020-1

Wei, B., Kumada, T., Furukawa, T., Inoue, K., Watanabe, M., Sato, K., Fukuda, A., 2013. Pre- and post-synaptic switches of GABA actions associated with Cl− homeostatic changes are induced in the spinal nucleus of the trigeminal nerve

in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Neuroscience 228, 334–348. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.043

Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L.E., Tsunoda, S., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., Magnuson, J., Hegemann, P., Deisseroth, K., 2011. The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. Cell 147, 1446–1457. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.004

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare, innanzitutto, la Professoressa Rita Bardoni per la fiducia concessami, la sua immensa dedizione e per il grande supporto lungo tutto questo percorso.
Ringrazio Andrea per le sue parole di conforto, per l'infinita pazienza ma, soprattutto, per i suoi insegnamenti e la passione che dimostra nel volerli trasmettere.

Ringrazio la mia piccola ma grande famiglia. Mia madre e mia sorella, donne forti ed esempi di vita. Mio sprone costante, senza il quale questo faticoso percorso non sarebbe sicuramente giunto al suo termine.
Le mie bambine, Giorgia e Nicole, fonte inesorabile di energia e vitalità e alle quali va il merito di avermi supportata e sopportata durante la preparazione di diversi esami.
Mio cognato Antonio, grande supporter e portatore di infinita pazienza, vivere con quattro donne non dev'essere facile!!

Ai miei zii, Enrico ed Emanuela, va il merito di andare oltre questo ruolo. Presenza costante e mai invadente, sempre rassicuranti e pronti all'ascolto. A Guido, il mio fratellone preferito, e a Rachele, santa donna che lo sopporta, vorrei dire che aspetto ancora la grigliata di fine estate!

Ad Alessandro, mio compagno di vita. Ti ringrazio per l'amore quotidiano e per il tuo grande supporto, soprattutto nei giorni no. Sei la persona più testarda, perseverante e generosa che io conosca e per questo sono infinitamente orgogliosa di averti accanto.

Ai miei amici di sempre, la mia seconda famiglia. A loro va il mio eterno affetto anche se, a causa delle distanze e del mio pessimo rapporto con la tecnologia, non sono sempre in grado di dimostrarlo.

A chi nella mia vita ci è entrato da poco, mi ha accolta, e che nonostante i miei difetti mi dimostra quotidianamente di voler restare.

Ed infine ringrazio Argo, il mio migliore amico.