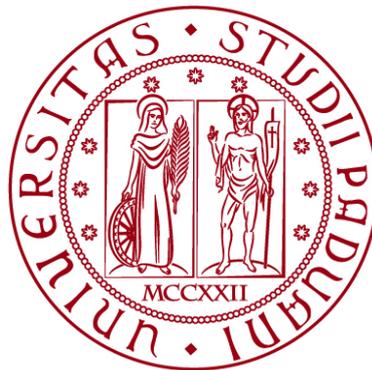


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Valutazione dello stato infiammatorio nel
muscolo scheletrico di topi distrofici D2-mdx
trattati con PXS-4699**

Tutor: Prof. Libero Vitiello

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Francesca Fontana

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Valentina Turis

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice

Abstract	1
1. Stato dell'arte	2
1.1 <i>Introduzione</i>	2
1.2 <i>Il quadro clinico</i>	2
1.3 <i>La diagnosi</i>	3
1.4 <i>La genetica</i>	3
1.5 <i>La distrofina</i>	3
1.6 <i>La patogenesi</i>	5
1.7 <i>Approcci terapeutici</i>	6
1.8 <i>Modelli animali</i>	6
2. Materiali e metodi	8
2.1 <i>Trattamento degli animali</i>	8
2.2 <i>Preparazione dei vetrini</i>	8
2.3 <i>Immunofluorescenza</i>	8
2.4 <i>Acquisizione delle immagini</i>	9
2.5 <i>Elaborazione delle immagini</i>	11
2.6 <i>Analisi statistica</i>	13
3. Risultati e discussione	14
3.1 <i>Considerazioni sul protocollo</i>	14
3.2 <i>Valutazione dell'efficacia del farmaco PXS-4699</i>	14
3.2.1 <i>Trattamento degli animali da 4 a 7 mesi di età</i>	15
3.2.2 <i>Trattamento degli animali da 5 a 8 mesi di età</i>	15
3.3 <i>Discussione</i>	16
Bibliografia	18

Abstract

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia monogenica ereditaria causata da mutazioni nel gene codificante la distrofina, situato sul cromosoma Xp21. La malattia viene trasmessa con modalità recessiva legata all'X quindi si manifesta nella popolazione maschile con un'incidenza di 1:5000 maschi nati vivi.

Nei pazienti affetti da DMD, la distrofina non risulta espressa a livello dei muscoli scheletrici e del miocardio; pertanto si assiste alla loro progressiva degenerazione e sostituzione fibro-adiposa. Questo quadro patologico risulta letale; infatti, i pazienti muoiono tra la terza e la quarta decade di vita per insufficienza respiratoria e/o cardiaca. Attualmente non esiste un trattamento definitivo che curi la malattia, ma attraverso l'uso di cure sintomatiche è possibile migliorare la qualità di vita dei pazienti. Ciò delinea l'importanza della ricerca di nuove molecole terapeutiche per il trattamento della DMD.

Questo lavoro di tesi si è proposto di valutare il possibile effetto terapeutico di un farmaco sperimentale, identificato come PXS-4699, che agisce come inibitore degli enzimi MAO-B (*Monoamine oxidase B*) e SSAO (*Semicarbazide-sensitive amine oxidase*) in un modello murino di distrofia di Duchenne, i topi D2-*mdx*. In particolare, il lavoro ha riguardato la quantificazione dell'infiltrato macrofagico nel muscolo tibiale anteriore degli animali in seguito al loro trattamento. I risultati ottenuti non hanno mostrato un effetto significativo del trattamento.

1. Stato dell'arte

1.1 Introduzione

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia neuromuscolare progressiva causata da mutazioni *loss-of-function* nel gene codificante la distrofina (DMD), localizzato sul cromosoma X in posizione p2.1. La trasmissione di questa patologia avviene con modalità recessiva e quindi colpisce prevalentemente i maschi; con un'incidenza di circa 1 su 5000 nati vivi, la DMD rappresenta la forma di distrofia muscolare più comune ^[1].

Le mutazioni associate alla DMD sono molteplici ed impediscono l'espressione della distrofina che, connettendo la F-actina citoscheletrica con la matrice extracellulare, garantisce alle fibre muscolari scheletriche la resistenza allo stress meccanico a cui è sottoposto il muscolo durante la contrazione ^[1]. Nei pazienti affetti dalla malattia quindi si osserva una progressiva degenerazione dei muscoli scheletrici e la sostituzione delle fibre muscolari con tessuto fibro-adiposo ^[2]. Inoltre, la malattia non colpisce soltanto la muscolatura scheletrica, ma anche il cuore; infatti, i pazienti spesso sviluppano cardiomiopatia dilatativa. Tra la terza e la quarta decade di vita, il grado di degenerazione del diaframma e del miocardio è tale da generare uno stato di insufficienza respiratoria e cardiaca che determina la morte prematura dei pazienti ^{[1][3]}.

1.2 Il quadro clinico

I primi segni clinici riconducibili alla DMD si manifestano tra i 2 e i 3 anni di età e consistono in disturbi della deambulazione come camminata ondeggiante, cadute frequenti, difficoltà ad alzarsi da terra ed a salire le scale. Tra i 10 e i 12 anni di età la capacità deambulatoria viene persa pertanto risulta necessaria la sedia a rotelle, il cui utilizzo contribuisce allo sviluppo di scoliosi e alla diminuzione della densità ossea, in quanto l'immobilità provoca alterazioni nella meccanotrasduzione, responsabile dell'equilibrio tra osteociti e osteoblasti. Infatti la mancanza di stimoli meccanici compromette l'osteogenesi, aumentando così la fragilità ossea e il rischio di fratture ^{[1][4]}.

Anche i muscoli respiratori risultano indeboliti nei pazienti affetti da DMD e la conseguente riduzione della funzione diaframmatica comporta una grave insufficienza respiratoria ^[1]. Questa condizione rende necessaria la ventilazione assistita che, secondo le meta-analisi pubblicate sull'*European Journal of Epidemiology*, aumenta la speranza di vita media da 19 ai 29,9 anni per i pazienti con supporto ventilatorio ^[5]. A seguito di questa implementazione terapeutica, la cardiomiopatia è dilatativa rappresenta attualmente la principale causa di morte dei pazienti affetti da DMD, che avviene tra la terza e la quarta decade di vita ^[3].

Circa un terzo dei pazienti affetti da DMD presenta anche disturbi cognitivi, neuropsicologici e neurocomportamentali come ADHD (deficit di attenzione/

iperattività), quoziente intellettivo (IQ) minore rispetto alla media, autismo ed epilessia^{[1][2][6]}

1.3 La diagnosi

La diagnosi è sospettata sulla base del quadro clinico, della storia familiare e della concentrazione sierica di alcuni marcatori, tra cui la creatina chinasi (CK). Per esempio, nei pazienti affetti da DMD, la concentrazione sierica di questo enzima risulta aumentata di circa 10-20 volte rispetto ai soggetti sani. La diagnosi deve essere confermata attraverso test di tipo genetico, al fine di identificare le mutazioni causative della malattia, attraverso l'amplificazione dipendente da sonda di legatura multiplex (MLPA) o sequenziamento Sanger^[2]. Nel caso in cui venga identificata una mutazione patogena nel gene *DMD* si procede con lo *screening* genetico della madre per verificare se sia portatrice della stessa mutazione identificata nel figlio affetto. Nell'eventualità in cui non venga identificata alcuna mutazione invece, si richiede una biopsia muscolare al fine di determinare la presenza o assenza di distrofina e nel caso in cui sia presente, valutare il suo peso molecolare e la sua localizzazione subcellulare^[6].

1.4 La genetica

Il gene *DMD* è il più lungo del genoma umano, in quanto si estende per 2.5 Mb, e contiene 79 esoni e 78 introni^[1]. A causa della sua dimensione, questo gene è soggetto ad un alto tasso mutazionale e le mutazioni che lo interessano si concentrano in due *hotspot* mutazionali, compresi tra gli esoni 3-9 e 45-55, e possono essere associate a due diversi fenotipi clinici, quali DMD e distrofia muscolare di Becker (BMD)^[3].

La DMD è causata principalmente da delezioni o duplicazioni *frameshift* e da mutazioni *nonsense* che impediscono l'espressione della distrofina^[3]. Circa un terzo delle mutazioni si verificano *de novo* e per i restanti 2/3 è causato da mosaicismo germinale o ereditarietà *X-linked* recessiva^[1]. La BMD, che si caratterizza per un fenotipo clinicamente eterogeneo e più lieve rispetto alla DMD, è causata invece da mutazioni che non alterano l'*open reading frame* del gene *DMD* quindi la distrofina viene espressa e, pur avendo un peso molecolare inferiore alla forma *wild-type*, essa risulta parzialmente funzionale^{[3][5]}.

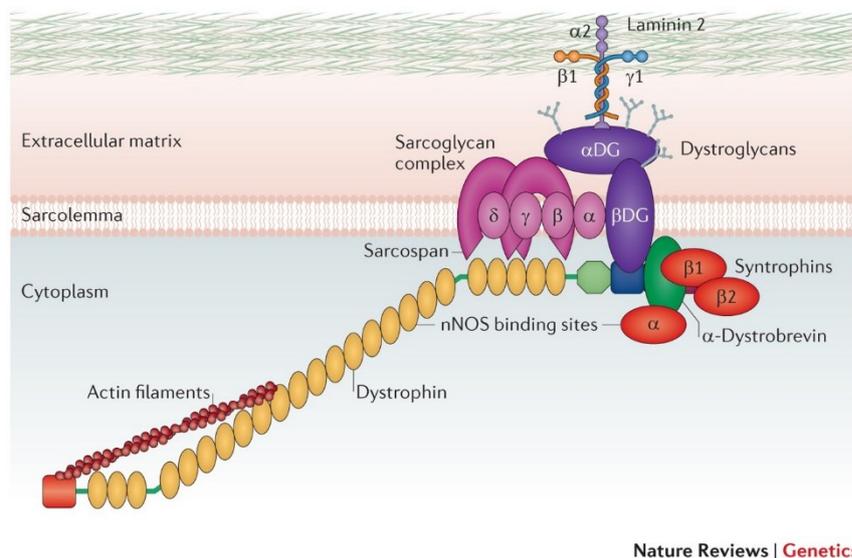
1.5 La distrofina

Il gene *DMD* codifica la distrofina, una proteina del citoscheletro che appartiene alla superfamiglia delle spettine. Nell'organismo umano sono presenti diverse isoforme della proteina che si distinguono tra loro per la localizzazione tissutale (i tessuti in cui è espressa la distrofina sono muscolo cardiaco, muscolo scheletrico, cervello, retina), il peso molecolare e la struttura terziaria^[6]. Tra queste, *Dp427m* rappresenta la principale isoforma espressa nel muscolo scheletrico e cardiaco e consiste in una proteina di 427 kDa organizzata in quattro domini:

- Dominio N-terminale, coinvolto nel legame con l'actina del citoscheletro;

- Dominio centrale bastoncellare contenente 24 ripetizioni *spectrin-like*, separate da quattro regioni cerniera, che determinano il ruolo della proteina nella stabilità meccanica nei cicli di contrazione muscolare;
- Dominio ricco in cisteina, che determina la localizzazione sub-sarcolemmale della distrofina attraverso l'interazione con proteine transmembrana;
- Dominio C-terminale.

Nel muscolo scheletrico, così come nel miocardio, la distrofina è coinvolta nella connessione della F-actina citoscheletrica con la matrice extracellulare (ECM), attraverso la formazione di un complesso multi-proteico, denominato complesso associato alla distrofina (DAPC). Pertanto, questa proteina svolge un ruolo essenziale nel mantenere l'integrità della membrana plasmatica delle cellule muscolari scheletriche e cardiache durante la contrazione muscolare [1]. Il suo ruolo centrale è illustrato in Figura 1.



Nature Reviews | Genetics

Figura 1. Organizzazione del complesso DAPC. Il complesso DAPC è costituito da proteine extracellulari, transmembrana e citoplasmatiche. La regione N-terminale della distrofina (in rosso) lega l'F-actina, ancorando il citoscheletro al complesso. Il dominio centrale bastoncellare (in giallo-arancione) contiene 24 ripetizioni *spectrin-like*, separate da quattro regioni cerniera evidenziate in verde. Questo presenta inoltre un secondo sito di legame per l'actina, come evidenziato in figura. Il dominio ricco in cisteina (in blu) ancora la distrofina al sarcolemma tramite l'interazione con una proteina di transmembrana, β -distroglicano (β DG) che a sua volta lega la laminina attraverso l' α -distroglicano (α DG) ancorando il complesso alla matrice extracellulare (ECM). Infine, il dominio C-terminale (in viola) lega le proteine citoplasmatiche del complesso, distrobrevine e sintrofine; formano una tripletta e legano la sintasi neuronale dell'ossido nitrico (nNOS) che a sua volta lega la distrofina tramite un sito di legame del dominio centrale [1]. Immagine: Fairclough, R., Wood, M. & Davies, K. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet* 14, 373–378 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrg3460>.

1.6 La patogenesi

Nel contesto del muscolo scheletrico, la mancata espressione della distrofina comporta il disassemblaggio del DAPC e di conseguenza il sarcolemma risulta più suscettibile allo stress meccanico a cui è sottoposto il muscolo durante la contrazione^[3].

Il danneggiamento sarcolemmale è dimostrato dalla presenza di lesioni delta, che consistono in micro-lesioni della membrana plasmatica delle fibre muscolari, ma anche da un'elevata concentrazione serica di enzimi che normalmente si localizzano nell'ambiente intracellulare dei miociti, come per esempio CK. La presenza di micro-lesioni nel sarcolemma ha diverse conseguenze^[1]. In primo luogo, esse determinano un continuo rilascio nell'ambiente extracellulare di *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), che legando i *Toll-Like Receptors* (TLR) e altri *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), scatenano una risposta immunitaria innata, i cui attori principali sono neutrofili e macrofagi pro-infiammatori o M1. Conseguentemente al rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte dei macrofagi M1, si instaura poi una risposta immunitaria adattativa, che cronicizzando contribuisce significativamente alla degenerazione del muscolo scheletrico. Nelle fasi iniziali della malattia, la degenerazione delle fibre muscolari è seguita dalla loro rigenerazione, che è possibile grazie alla attivazione delle cellule satelliti, ovvero le cellule staminali del muscolo scheletrico^[7]. Con la progressione della patologia, si verifica un esaurimento delle cellule satelliti quindi la rigenerazione tissutale diminuisce sempre più e il muscolo scheletrico viene progressivamente sostituito con tessuto fibroso ed adiposo^[6].

Un'altra conseguenza diretta della presenza delle lesioni delta a livello sarcolemmale è l'aumento della concentrazione nel citosol degli ioni calcio (Ca^{2+})^[1]. Il Ca^{2+} viene rilasciato anche dal reticolo endoplasmatico, in associazione ad una ridotta attività della pompa Ca^{2+} ATPasi del reticolo sarco-endoplasmatico (SERCA)^[1]. La perdita dell'omeostasi di questo ione ha un impatto negativo su molteplici *pathways* cellulari e sul funzionamento di alcuni organelli cellulari, tra cui i mitocondri^[1]. L'incremento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} , determinando l'apertura dei pori di transizione di permeabilità, è accompagnato da un aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna ed esterna. Conseguentemente a questo evento si osserva il rilascio nel citosol di citocromo c, a cui segue l'attivazione delle caspasi e l'apoptosi^[3]. Inoltre, il processo di transizione di permeabilità è associato anche ad una diminuzione della sintesi di ATP; infatti, l'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna altera il suo potenziale e di conseguenza influisce negativamente sul processo di fosforilazione ossidativa^{[1][3]}.

La disfunzione mitocondriale è responsabile a sua volta di un'eccessiva produzione di ROS che comporta l'instaurarsi di una condizione di stress ossidativo nel muscolo distrofico. I ROS hanno effetti deleteri su tutte le macromolecole, infatti essi sono responsabili di perossidazione lipidica, danni al DNA e alle proteine. Queste specie radicaliche quindi contribuiscono significativamente alla degenerazione muscolare^[1].

1.7 Approcci terapeutici

Al momento non esiste una terapia definitiva per la DMD e gli approcci terapeutici attualmente disponibili consentono di ritardare la progressione della malattia e alleviare la sintomatologia ad essa associata. In particolare, Prednisone e Deflazacort sono i farmaci più frequentemente somministrati nei pazienti affetti da DMD, in quanto ritardano la perdita della capacità deambulatoria, attenuano le complicanze polmonari e cardiovascolari e riducono la mortalità. Tuttavia, l'utilizzo prolungato di questi corticoidi è associato a numerosi effetti avversi, quali l'aumento di peso, l'osteoporosi e il maggiore rischio di fratture^[5].

Le strategie terapeutiche più innovative invece mirano a ripristinare l'espressione della distrofina a livello muscolare attraverso le tecniche di *exon-skipping*, *AAV-mediated gene therapy*, *genome editing* con il sistema CRISPR/Cas e *stop codon readthrough*. Altri approcci terapeutici in via di studio si propongono come target l'infiammazione, l'eccessiva produzione di ROS e la perdita dell'omeostasi del calcio, tutte conseguenze della mancata espressione di distrofina nel muscolo scheletrico^[8].

1.8 Modelli animali

Tra i modelli animali più utilizzati per lo studio della DMD rientra sicuramente il modello murino *mdx* (C57BL/10ScSn-*Dmd*^{*mdx*}/J), che possiede una mutazione *nonsense* nell'esone 23 del gene *DMD*^[9]. Esso presenta un fenotipo patologico più mite rispetto all'uomo; infatti, la degenerazione tissutale è compensata da una forte capacità rigenerativa del muscolo e anche negli stadi più avanzati della malattia manifesta solo una lieve insufficienza cardiaca^{[3][10]}. Questa differenza rappresenta un limite nel passaggio da animale a uomo nei *trial* clinici, pertanto, la ricerca ha cercato di "umanizzare" il modello per replicare in animale la complessità metabolica della malattia^[10]. L'incrocio tra gli animali BL10-*mdx* e *wildtype* DBA/2J ha consentito di ottenere il modello D2.B10-*Dmd*^{*mdx*}/J (D2-*mdx*)^[9]. In particolare, i topi D2-*mdx* mostrano rispetto ai topi *mdx* una riduzione significativa della massa corporea e del peso dei muscoli degli arti posteriori ed un'aumentata debolezza muscolare. Si osservano anche una diminuzione delle miofibre e una rigenerazione muscolare attenuata, oltre ad alti livelli di calcificazione nei muscoli già in età precoce^[9]. Questa maggiore severità del fenotipo patologico è legata a un polimorfismo nella regione codificante di *LTBP4*, che determina l'aumento dell'attività del TGF^[10].

Questa tesi si propone di valutare l'efficacia del farmaco sperimentale PXS-4699 sull'infiammazione, un inibitore degli enzimi MAO-B (*Monoamine oxidase B*) e SSAO (*Semicarbazide-sensitive amine oxidase*), coinvolti nello stress ossidativo e nell'infiammazione^{[11][12]}. La presente ricerca si concentra sull'infiammazione, con l'obiettivo di quantificare i macrofagi nell'infiltrato infiammatorio del muscolo tibiale anteriore degli animali D2-*mdx* in seguito al loro trattamento.

2. Materiali e metodi

2.1 Trattamento degli animali

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati topi maschi appartenenti al ceppo D2-*mdx*. In particolare, gli animali sono stati divisi in due gruppi sperimentali:

- Gruppo trattati (PXS), composto da 5 topi di 7 mesi e 3 di 8 mesi;
- Gruppo di controllo (K), costituito da un totale di 12 animali, divisi equamente tra le due età.

I topi appartenenti al gruppo PXS sono stati trattati con il farmaco PXS-4699 (Pharmaxis) che agisce inibendo gli enzimi MAO-B (*Monoamine oxidase B*) e SSAO (*Semicarbazide-sensitive amine oxidase*) coinvolti nello stress ossidativo e nell'infiammazione ^{[11][12]}. Nello specifico, il loro trattamento ha previsto la somministrazione orale del farmaco per 3 mesi a partire dai 4 o 5 mesi di vita. Dopo questo periodo, gli animali sono stati sacrificati e da essi sono stati prelevati il cuore, il diaframma, il gastrocnemio e il tibiale anteriore. I diversi muscoli sono stati poi congelati rapidamente in azoto liquido e conservati a -80°C.

2.2 Preparazione dei vetrini

Il muscolo tibiale anteriore è stato sezionato al criostato (Leica Biosystems) al fine di ricavare per ciascun animale tre o quattro sezioni tissutali di spessore pari a 12µm, che sono state fatte aderire su appositi vetrini (SuperFrost, Thermo Fisher Scientific), conservati anch'essi a -80°C.

2.3 Immunofluorescenza

Le sezioni di muscolo tibiale anteriore sono state re-idratate con *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), fissate con paraformaldeide (PFA) al 4% in PBS per 10 minuti e lavate con PBS. La PFA è una sostanza tossica pertanto il passaggio di fissazione è stato condotto sotto cappa chimica. Successivamente, le sezioni sono state saturate prima con IgG anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, 115-007-003) diluite 1:25 in una soluzione di albumina sierica bovina (BSA) al 3% in PBS per un'ora e poi con siero di capra al 10% in PBS per 45 minuti. La saturazione con IgG anti-mouse risulta fondamentale quando si utilizza un anticorpo primario prodotto in ratto e un anticorpo secondario anti-ratto per riconoscere una proteina murina. Infatti, i topi e i ratti appartenendo a specie diverse ma evolutivamente vicine, presentano antigeni strutturalmente simili, il che può portare l'anticorpo secondario a riconoscere, oltre all'anticorpo primario, anche componenti murine, dando così segnali aspecifici. La saturazione con siero di capra invece è uno step comune a tutte le tecniche istochimiche ed è finalizzato a bloccare eventuali antigeni nel tessuto che potrebbero essere legati in maniera aspecifica dall'anticorpo primario e secondario. Le sezioni tissutali sono state lavate con PBS e incubate per tutta la notte con un anticorpo primario prodotto in ratto e specifico per F4/80 (Biorad, MCA497RT) diluito 1:200 in BSA al 3% in PBS. F4/80 è una glicoproteina di superficie di circa 160 kDa appartenente alla famiglia di proteine EGF-TM7. La sua espressione è variabile tra i tessuti e ed è un valido marker per individuare la presenza di macrofagi.

Il giorno successivo, le sezioni sono state sottoposte a tre lavaggi, tutti della durata di cinque minuti, al fine di rimuovere gli anticorpi primari non legati al target. In particolare, le sezioni sono state lavate prima con PBS, poi con Triton allo 0,5% in PBS e infine con PBS. In seguito, le sezioni di tibiale anteriore sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-ratto prodotto in asino e coniugato con il fluoroforo Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch, 712-545-150) diluito 1:500 in BSA al 3% in PBS. Prima del suo utilizzo, la mix contenente l'anticorpo secondario è stata centrifugata a 4°C per 15 minuti per evitare di aliquotare aggregati di anticorpi. Al termine dell'incubazione dell'anticorpo secondario, le sezioni sono state lavate come descritto in precedenza per eliminare gli anticorpi in eccesso e il vetrino copri oggetto è stato montato utilizzando un *mounting medium* contenente DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindolo), una molecola fluorescente in grado di legare il DNA con alta affinità. Infine, ciascun vetrino è stato sigillato con lo smalto, in modo da evitare la disidratazione delle sezioni.

La Figura 2 è una rappresentazione schematica della tecnica di immunofluorescenza indiretta appena descritta.

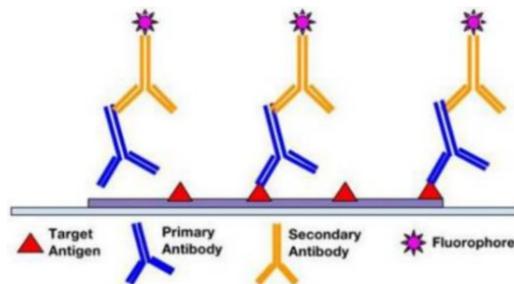


Figura 2. Immagine illustrativa del funzionamento dell'immunofluorescenza indiretta. L'anticorpo primario lega l'antigene; l'anticorpo secondario coniugato ad un fluoroforo ha come target l'anticorpo primario. Immagine: K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299-311.

2.4 Acquisizione delle immagini

La visualizzazione dei vetrini e l'acquisizione delle immagini relative alle singole sezioni tissutali hanno richiesto l'utilizzo di un microscopio ad epifluorescenza Leica DM6B (Leica Microsystems), con associato il software LAS X Suite (versione 3.7.6.25997).

Per ogni sezione sono state acquisite le immagini relative a 3-6 campi diversi, scelti in base alla fluorescenza del DAPI (fluorescenza in blu) piuttosto che a quella del fluoroforo coniugato all'anticorpo secondario (fluorescenza in verde). Questo accorgimento è stato adottato per evitare di introdurre un *bias* nei dati, che potrebbe verificarsi qualora si selezionassero i campi basandosi sulla fluorescenza del fluoroforo, preferendo così le aree in cui il segnale è presente in misura maggiore. In particolare, per ogni campo selezionato sono state acquisite le immagini relative a:

- Fluorescenza in blu (filtro di eccitazione ATL), che permette la visualizzazione dei nuclei delle cellule grazie al DAPI;
- Fluorescenza in verde (filtro di eccitazione I3), che rileva il segnale del fluoroforo Alexa Fluor 488 legato all'anticorpo secondario; la fluorescenza verde indica i macrofagi F4/80 positivi, mentre il giallo corrisponde all'autofluorescenza dei macrofagi negativi per lo stesso marker;
- Fluorescenza in rosso (filtro di eccitazione N21), in cui si osserva l'autofluorescenza di tutti i macrofagi presenti in quella sezione, indipendentemente dalla positività all'anticorpo;
- Sovrapposizione delle immagini relative alla fluorescenza in blu, verde e rosso.

La Figura 3 mostra il set di foto che si ottiene per ciascun campo selezionato.

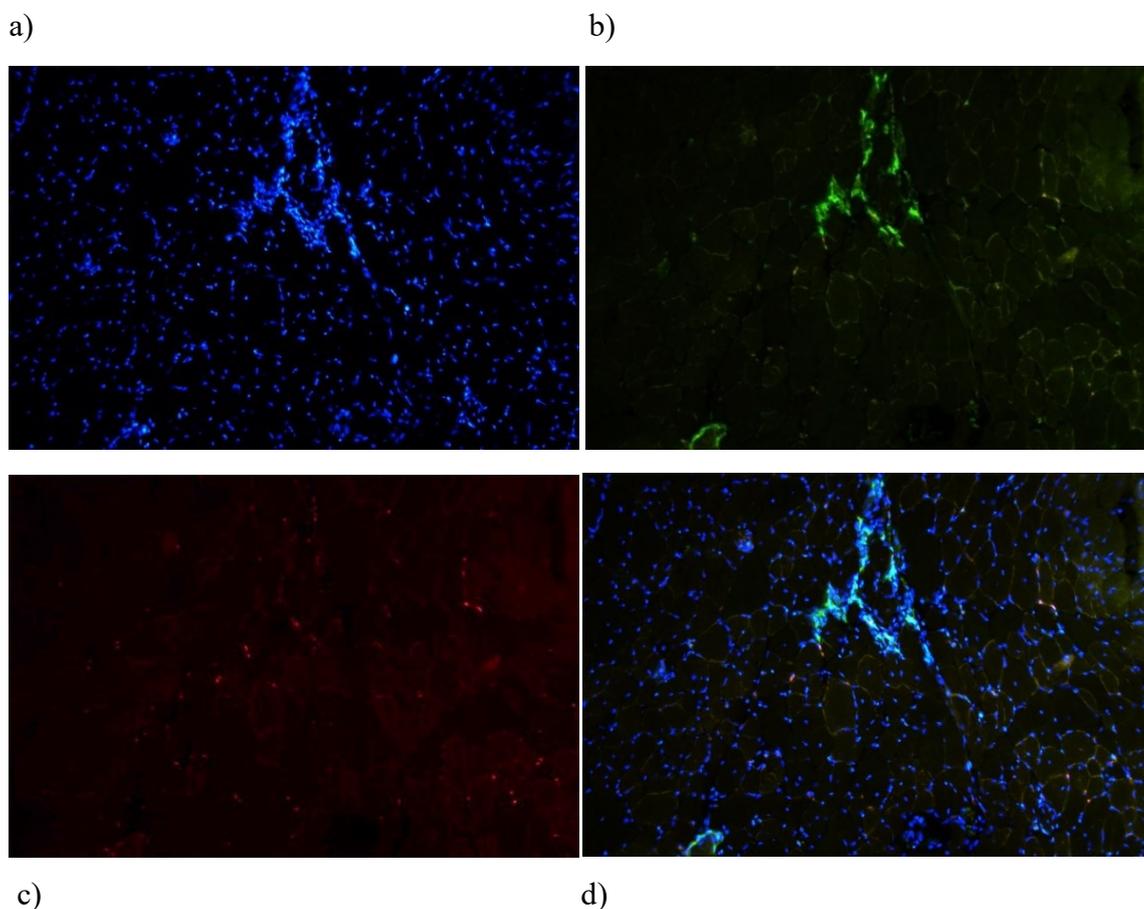


Figura 3. Esempio di un set di immagini relative a ciascun campo selezionato all'interno di una sezione di tibiale anteriore. a) La fluorescenza in blu consente l'identificazione delle cellule grazie alla colorazione nucleare con il DAPI. b) La fluorescenza in verde permette di distinguere i macrofagi positivi per F4/80 (verde) e i macrofagi negativi per lo stesso marcatore (giallo). c) La fluorescenza in rosso permette di individuare i macrofagi esclusivamente in base alla loro autofluorescenza. d) Sovrapposizione della fluorescenza in blu, verde e rosso.

Le immagini sono state acquisite utilizzando l'obiettivo 20X e applicando i parametri di esposizione, *gain*, saturazione e gamma riportati in Tabella 1. Questi

sono stati impostati sulla base del vetrino di controllo negativo al fine di ottenere una visualizzazione ottimale del segnale. Il vetrino relativo al controllo negativo non è stato incubato con l'anticorpo primario, ma soltanto con il secondario.

	Fluorescenza in blu	Fluorescenza in verde	Fluorescenza in rosso
Esposizione	108,26	550	448,78
Gain	1,99	1,99	1,99
Saturazione	33	33	33
Gamma	1,3	1,3	1,3

Tabella 1. I parametri scelti per l'acquisizione delle immagini.

2.5 Elaborazione delle immagini

L'elaborazione delle immagini acquisite per ciascuna sezione di tibiale anteriore è stata possibile attraverso il software Adobe Photoshop (versione 25.9). Questo lavoro di tesi si proponeva inizialmente di quantificare i macrofagi positivi per F4/80 tuttavia, per i motivi discussi nella sezione Risultati, si è proceduto con la quantifica dei macrofagi sia positivi che negativi per tale marcatore. A tale scopo non sono state analizzate le immagini acquisite utilizzando il filtro I3 ma N21.

Una volta aperta l'immagine nel programma è stato regolato il contrasto a 50 per evidenziare la differenza tra il sottofondo e il segnale di autofluorescenza. A tal proposito si è seguito il percorso di comandi: *>Immagine >Regolazioni >Luminosità/contrasto*.

Per selezionare il segnale relativo ai macrofagi, i comandi utilizzati sono: *>Immagine >Selezione >Intervallo colori*. Nella scheda *pop-up* mostrata in Figura 4 si seleziona l'opzione "Colori campionati" e tramite lo strumento "Aggiungi colore", identificato con il simbolo , sono stati selezionati i colori che nell'immagine sono riconosciuti come segnale, mantenendo la tolleranza a 40. A questa selezione è possibile aggiungere o rimuovere elementi.

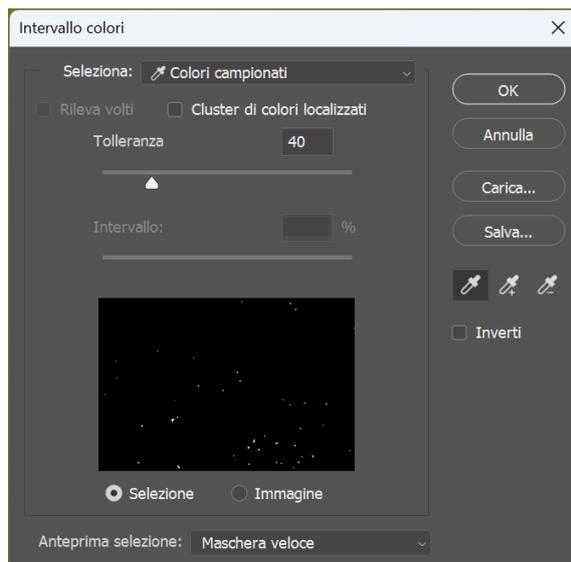


Figura 4. Scheda *pop-up* di Photoshop: riquadro per impostare i parametri della selezione.

Per una migliore identificazione del segnale sono state visualizzate le foto ottenute con i diversi filtri di eccitazione, ma anche quella che sovrappone la fluorescenza in blu, rosso e verde. Nella Figura 5 è possibile visualizzare un esempio di selezione.

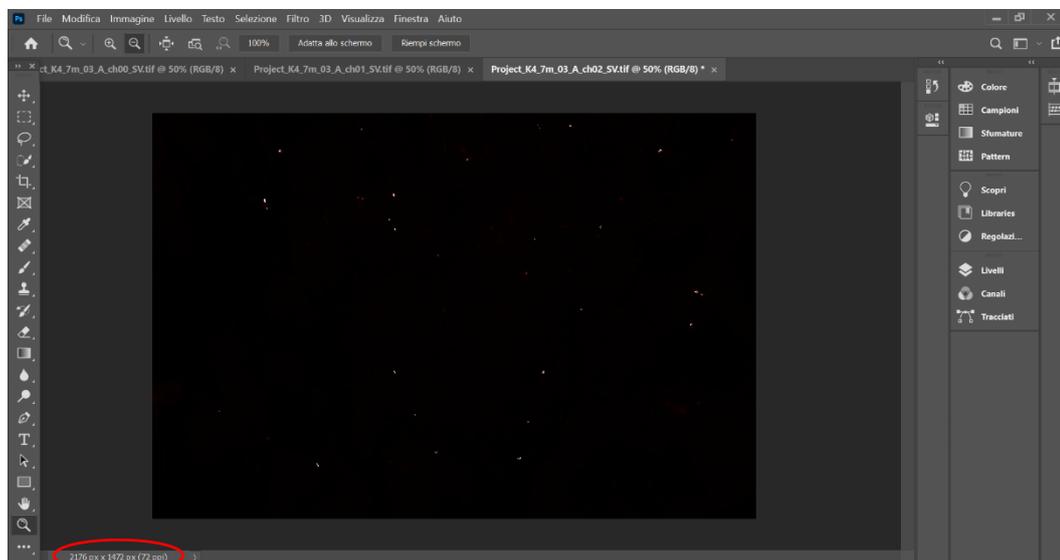


Figura 5. Schermata di Photoshop della selezione creata. Gli elementi selezionati sono contornati di bianco. Il numero di pixel cerchiati in rosso si riferisce a base ed altezza dell'immagine, il cui prodotto determina l'area totale.

Una volta ottenuta la selezione, si è proceduto con la quantificazione del segnale e quindi con il calcolo del rapporto tra il numero di pixel selezionati e il numero totale di pixel dell'immagine. Nel caso in cui nella foto fossero presenti spazi privi di tessuto si è provveduto a ricalcolare il numero dei pixel totali. Il numero di pixel

corrispondente all'area selezionata viene fornito dal software attraverso i passaggi:
>*Immagine* >*Analisi* >*Misura registrazione*.

Questi passaggi sono stati ripetuti per ciascun set di foto.

2.6. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso l'utilizzo del software Prism GraphPad (versione 10.3.0), utilizzando il saggio Nested t-test su dati precedentemente trasformati in scala logaritmica.

I grafici riportano la media dei valori e l'errore standard della media (SEM).

3. Risultati e discussione

3.1 Considerazioni sul protocollo

Questo lavoro tesi si proponeva inizialmente di quantificare i macrofagi positivi per il marcatore F4/80 nel muscolo tibiale anteriore di animali D2-*mdx* trattati con il farmaco PXS-4699. Pertanto, le sezioni tissutali ottenute per gli animali coinvolti in questo studio sono state sottoposte a un esperimento di immunofluorescenza, funzionale a quantificare i macrofagi positivi per il marcatore di interesse. L'elevata autofluorescenza in verde delle fibre muscolari, che è possibile apprezzare in Figura 6, ha impedito però la distinzione del segnale relativo al fluoroforo AlexaFluor 488 coniugato all'anticorpo secondario utilizzato nell'esperimento da quello relativo alla membrana plasmatica delle stesse cellule. Non essendo possibile la distinzione tra segnale specifico e aspecifico nelle immagini relative alla fluorescenza in verde, si è preferito quantificare i macrofagi, sia positivi che negativi per F4/80, sfruttando la loro autofluorescenza in rosso. Quindi, per la quantificazione di queste cellule del sistema immunitario sono state impiegate le immagini acquisite con il filtro di eccitazione N21, anziché I3, relative alla fluorescenza in rosso.

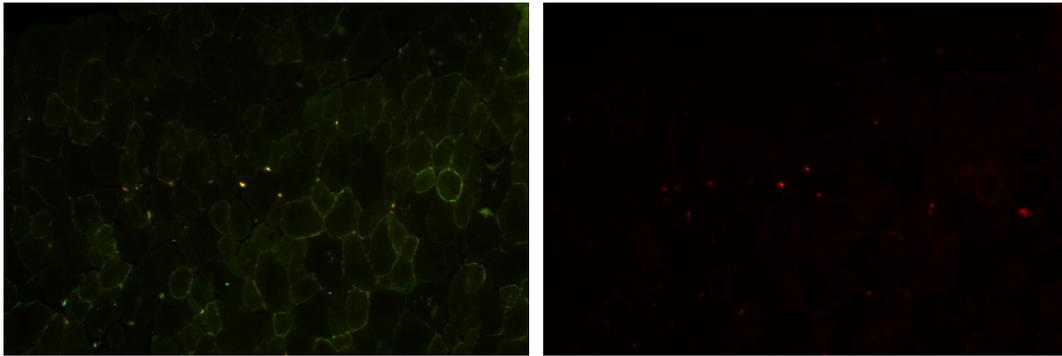


Figura 6. Immagini di muscolo tibiale anteriore acquisite con i filtri di eccitazione I3 e N21. a) Nell'immagine acquisita con filtro I3, la membrana plasmatica delle fibre muscolari ha un'elevata autofluorescenza in verde quindi in questo tipo di immagine non è possibile distinguere il segnale specifico dei macrofagi positivi per F4/80. b) Come mostra l'immagine acquisita con filtro N21, la membrana delle fibre muscolari non ha una spiccata autofluorescenza in rosso.

3.2 Valutazione dell'efficacia del farmaco PXS-4699

Per questo lavoro di tesi sono stati considerati 20 topi D2-*mdx* maschi appartenenti a due gruppi sperimentali, K (gruppo di controllo, n = 12) e PXS (gruppo di trattati, n = 8). Il trattamento degli animali con il farmaco PXS-4699 è stato valutato in due diversi intervalli di età: nello specifico, 5 topi del gruppo PXS sono stati trattati a partire dai 4 mesi mentre i restanti 3 sono stati trattati a partire dai 5 mesi di età. Per ogni animale sono state analizzate 3-4 sezioni di muscolo tibiale anteriore e per ogni sezione sono state acquisite dalle 3 alle 6 immagini.

3.2.1 Trattamento degli animali da 4 a 7 mesi di età

La somministrazione di PXS-4699 agli animali D2-*mdx* nell'intervallo temporale compreso tra i 4 e 7 mesi di età non comporta una variazione significativa del numero di macrofagi (Figura 7). Infatti, il Nested t-test, svolto su dati precedentemente trasformati in scala logaritmica, fornisce un *p-value* di 0,9845.

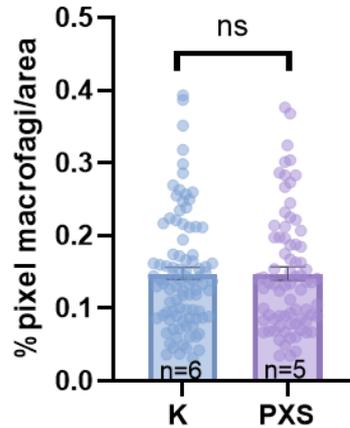


Figura 7. Trattamento degli animali D2-*mdx* da 4 a 7 mesi di età. Il grafico mostra la distribuzione dei dati tra i due gruppi sperimentali presi in considerazione. L'asse y corrisponde al rapporto percentuale del numero di pixel selezionati che costituiscono il segnale autofluorescente dei macrofagi rispetto all'area totale del tessuto espressa in pixel. Ogni punto del grafico corrisponde ai dati misurati da una singola immagine. In azzurro sono riportati di dati il gruppo di controllo (K) ed in lilla quelli del gruppo dei trattati (PXS); "n" si riferisce alla numerosità di ciascun gruppo sperimentale. Nel grafico è rappresentata la media e l'errore standard della media. Il *p-value* fornito dall'analisi statistica non è significativo, come indicato in figura (ns = non significativo).

3.2.2 Trattamento degli animali da 5 a 8 mesi di età

Il trattamento degli animali D2-*mdx* è stato valutato anche in un secondo intervallo di età, ovvero da 5 a 8 mesi. Il Nested-t-test fornisce un *p-value* pari 0,8491 quindi anche in questo condizione sperimentale il trattamento non ha determinato una variazione nel numero di macrofagi infiltranti il muscolo tibiale anteriore (Figura 8).

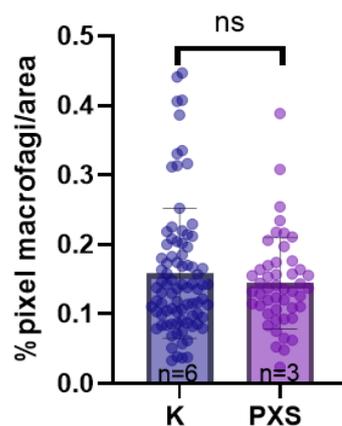


Figura 8. Trattamento degli animali D2-*mdx* da 5 a 8 mesi di età. Il grafico mostra la distribuzione dei dati tra i due gruppi sperimentali presi in considerazione. L'asse y corrisponde al rapporto percentuale del numero di pixel selezionati che costituiscono il segnale autofluorescente dei macrofagi rispetto all'area totale del tessuto espressa in pixel. Ogni punto del grafico corrisponde ai dati misurati da una singola immagine. In blu sono riportati di dati il gruppo di controllo (K) ed in viola quelli del gruppo dei trattati (PXS); “n” si riferisce alla numerosità di ciascun gruppo sperimentale. Nel grafico è rappresentata la media e l'errore standard della media. Il p-value fornito dall'analisi statistica non è significativo, come indicato in figura (ns = non significativo).

3.3 Discussione

I risultati ottenuti con questo progetto di tesi non evidenziano una variazione statisticamente significativa nel numero di macrofagi infiltranti il tibiale anteriore degli animali D2-*mdx*, trattati con il farmaco sperimentale PXS-4699. In futuro sarà importante riuscire a quantificare i macrofagi positivi per il marcatore F4/80; infatti, sulla base dei risultati ottenuti con questo lavoro, non è possibile prevedere se la numerosità di questa popolazione cellulare si riduca o meno in seguito al trattamento. Le strategie attuabili per far fronte all'impossibilità di distinguere il segnale specifico da quello aspecifico a causa dell'elevata autofluorescenza delle fibre muscolari nelle immagini acquisite con il filtro I3 sono diverse, e tra queste si annoverano l'utilizzo di un agente fissativo alternativo alla PFA e l'impiego di un reagente come Sudan Black B, mirato a ridurre l'autofluorescenza e migliorare la risoluzione del segnale fluorescente.

Per una valutazione più approfondita dello stato infiammatorio, si potrebbero eseguire ulteriori esperimenti di immunofluorescenza per valutare la composizione cellulare dell'infiltrato infiammatorio, come i neutrofili. Integrare questa analisi consentirà una comprensione più completa degli effetti del trattamento sull'infiammatori.

Negli animali D2-*mdx* trattati con PXS-4699, l'infiammazione potrebbe essere valutata anche nel diaframma e nel cuore, che rappresentano i muscoli più gravemente colpiti nei pazienti affetti da DMD ^[1].

Oltre alla condizione di infiammazione, la DMD si caratterizza per la degenerazione e la sostituzione con tessuto fibro-adiposo della muscolatura scheletrica e cardiaca ^[2]. Pertanto, negli animali trattati con PXS-4699 sarebbe interessante quantificare la fibrosi nei muscoli tibiale anteriore, diaframma e gastrocnemio. A tale scopo possono essere utilizzate diverse tecniche e tra queste si annovera la colorazione istologica con Sirius Red. Questo colorante infatti consente di distinguere nel contesto di una sezione tissutale il muscolo, che si colora in giallo, dalla fibrosi, che si colora in rosso.

Infine, i muscoli distrofici sono interessati da una condizione di stress ossidativo, conseguentemente alla disfunzione mitocondriale ^[3]. Quindi, per verificare un eventuale effetto del trattamento con PXS-4699 su questo specifico aspetto nuove sezioni tagliate dai muscoli degli animali sperimentali potrebbero essere analizzate con delle sonde specifiche per misurare i livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali ad esempio il diidrotidolo (DHE).

Bibliografia

1. Bez Batti Angulski A, Hosny N, Cohen H, Martin AA, Hahn D, Bauer J, Metzger JM. *Duchenne muscular dystrophy: disease mechanism and therapeutic strategies*. Front Physiol. 2023 Jun 26;14:1183101. doi: 10.3389/fphys.2023.1183101. PMID: 37435300; PMCID: PMC10330733.
2. Venugopal V, Pavlakis S. *Duchenne Muscular Dystrophy*. [Updated 2023 Jul 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482346/>
3. Gandhi S, Sweeney HL, Hart CC, Han R, Perry CGR. *Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy and the Potential for Mitochondrial Therapeutics to Improve Treatment Response*. Cells. 2024 Jul 9;13(14):1168. doi: 10.3390/cells13141168. PMID: 39056750; PMCID: PMC11274633.
4. Liedert A, Kaspar D, Blakytyn R, Claes L, Ignatius A. *Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Oct 13;349(1):1-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.214. Epub 2006 Aug 14. PMID: 16930556.
5. Hakimi M, Burnham T, Ramsay J, Cheung JW, Goyal NA, Jefferies JL, Donaldson D. *Electrophysiologic and cardiovascular manifestations of Duchenne and Becker muscular dystrophies*. Heart Rhythm. 2024 Jul 10:S1547-5271(24)02882-0. doi: 10.1016/j.hrthm.2024.07.008. Epub ahead of print. PMID: 38997055.
6. Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. *Duchenne muscular dystrophy*. Nat Rev Dis Primers. 2021 Feb 18;7(1):13. doi: 10.1038/s41572-021-00248-3. PMID: 33602943; PMCID: PMC10557455.
7. Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA, Wakefield LM, Woodcock J. *Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy*. Sci Transl Med. 2015 Aug 5;7(299):299rv4. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7322. PMID: 26246170; PMCID: PMC5951380.
8. Krishna L, Prashant A, Kumar YH, Paneyala S, Patil SJ, Ramachandra SC, Vishwanath P. *Molecular and Biochemical Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy*. Neurol Int. 2024 Jul 5;16(4):731-760. doi: 10.3390/neurolint16040055. PMID: 39051216; PMCID: PMC11270304.
9. van Putten M, Putker K, Overzier M, Adamzek WA, Pasteuning-Vuhman S, Plomp JJ, Aartsma-Rus A. *Natural disease history of the D2-mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy*. FASEB J. 2019 Jul;33(7):8110-8124. doi: 10.1096/fj.201802488R. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30933664; PMCID: PMC6593893.
10. Donen G, Milad N, Bernatchez P. *Humanization of the mdx Mouse Phenotype for Duchenne Muscular Dystrophy Modeling: A Metabolic Perspective*. J Neuromuscul Dis. 2023;10(6):1003-1012. doi: 10.3233/JND-230126. PMID: 37574742; PMCID: PMC10657711.
11. Menazza S, Blaauw B, Tiepolo T, Toniolo L, Braghetta P, Spolaore B, Reggiani C, Di Lisa F, Bonaldo P, Canton M. *Oxidative stress by*

monoamine oxidases is causally involved in myofiber damage in muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2010 Nov 1;19(21):4207-15. doi: 10.1093/hmg/ddq339. Epub 2010 Aug 17. PMID: 20716577.

12. Kinemuchi H., Sugimoto H., Obata T., Satoh N., Ueda S. *Selective inhibitors of membrane-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in mammalian tissues.* Neurotoxicology. 2004 Jan; 25(1-2):325-351