



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

**Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”**

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

**Studio immunoistochimico della Osteogenesi Imperfetta:  
analisi su fegato e rene nel modello sperimentale murino Brtl**

Relatore:

*Prof.ssa Maria Grazia Bottone*

Correlatore:

*Dott. Enrico Pelloni*

Tesi Sperimentale di  
*Matilde Reffi*

Anno Accademico 2024/2025



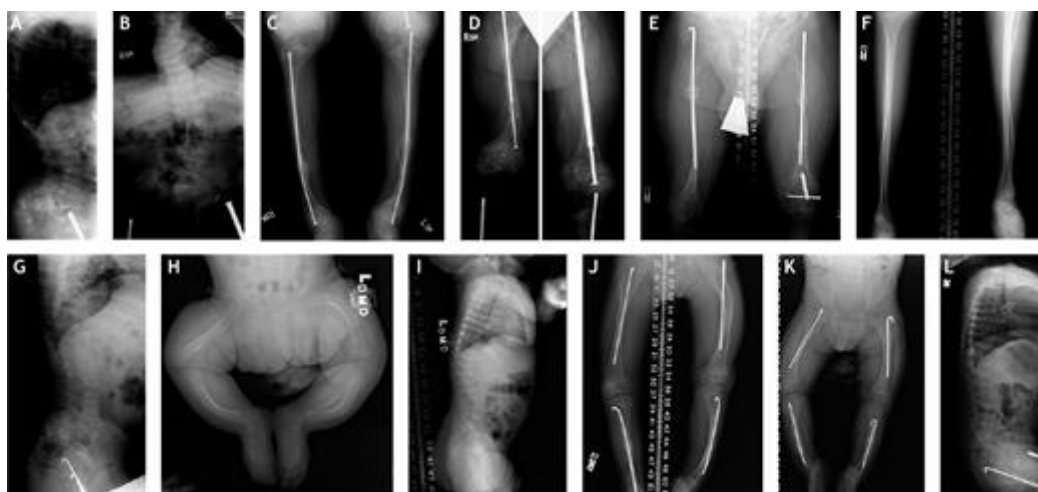
## INDICE

INTRODUZIONE.....	4
Osteogenesi Imperfetta.....	4
Il collagene.....	6
Terapie .....	10
Modelli sperimentali .....	11
Anatomia e istologia comparata di fegato e rene nel topo.....	15
Fegato .....	15
Rene .....	22
Anticorpi primari utilizzati.....	33
P62.....	34
LC3B.....	36
PARP1 .....	39
P53.....	41
SCOPO DEL LAVORO .....	45
MATERIALI E METODI.....	46
Scelta dei campioni .....	46
Preparazione organi: embedding .....	46
Idratazione dei campioni.....	49
Colorazione morfologica istochimica: ematossilina/eosina .....	49
Colorazione morfologica istochimica: tricromica di Picro Mallory .....	49
Reazione immunostochimica: principi base e protocollo .....	51
Principi base.....	51
Protocollo interno di immunostochimica.....	52
Diluizioni e tempo di incubazione della DAB.....	54
Disidratazione e montaggio dei vetrini.....	55
Cattura.....	55
Analisi foto e statistiche.....	56
RISULTATI.....	57
Conta cellulare.....	57
Autofagia e apoptosi nel fegato .....	61
Danno al DNA nel fegato .....	63
Autofagia e apoptosi nel rene .....	65
Danno al DNA nel rene.....	67
Colorazione tricromica di Picro-Mallory. Analisi in parallelo di fegato e rene .....	70
DISCUSSIONE.....	73
CONCLUSIONI .....	78
BIBLIOGRAFIA .....	79

## INTRODUZIONE

### Osteogenesi Imperfetta

L'Osteogenesi Imperfetta (OI), detta anche “Malattia delle ossa fragili” (“*Brittle bone disease*”), è una famiglia di malattie genetiche rare causata dalla produzione anomala di diversi tipi di collagene, con caratteristiche fenotipiche e genetiche definite, accomunate da fragilità ossea. Questa patologia rientra nella super-famiglia delle collagenopatie, ossia patologie che comportano anomalie nella produzione, nella struttura o nella modificazione post-traduzionale del collagene. L'OI colpisce una persona ogni 10.000 nati vivi in tutto il mondo e questa condizione colpisce maschi e femmine con un'incidenza molto simile. L'età di esordio della malattia dipende dalla sua gravità (Orphanet, *ORPHA:666*).



*Figura 1 Lastre di raggi X di pazienti con OI, mostrano la variabilità fenotipica associata alla stessa sostituzione della glicina con altri amminoacidi (Garibaldi et al., 2022).*

I fenotipi principali dell'OI si possono dividere in manifestazioni scheletriche ed extra-scheletriche. Le caratteristiche scheletriche comprendono: macrocefalia, faccia media piatta e facies triangolare, dentinogenesi imperfecta, deformità della parete toracica (come pectus excavatum o carinatum), torace a botte e scoliosi o cifosi. Le radiografie scheletriche rivelano osteopenia generalizzata e una combinazione di incurvamento delle

ossa lunghe, ipotubulazione e svasamento metafisario, coste gracili, apice toracico stretto e compressioni vertebrali (Hald et al., 2024).

Fra le caratteristiche extra-scheletriche vi sono: sclere blu, manifestazioni craniofacciali, sintomi gastro-intestinali, malattie cardiopolmonari, lesioni muscolari e tendinee e dolori, alterazioni dei tessuti molli, dell'udito, della vista, della salute dentale e della salute femminile. In particolare, le caratteristiche secondarie più comuni del disturbo sono assenti nelle forme recessive di recente riconoscimento, che generalmente presentano sclere bianche e dimensioni craniche, denti e udito normali.

Sia le caratteristiche scheletriche, sia le extra-scheletriche, influenzano la qualità della vita dei pazienti con OI durante tutto l'arco della loro vita, specialmente in età adulta e nell'invecchiamento, considerando che la maggior parte degli studi e dell'epidemiologia fa riferimento a pazienti e studi condotti su soggetti in età giovane, è altrettanto importante e interessante analizzare anche soggetti adulti/anziani.

Sono state individuate cinque classi di OI definite dalla gravità della malattia stessa:

tipo 1 – è lieve e non produce effetti significativi sull'aspettativa e la qualità della vita del paziente

tipo 2 – è letale

tipo 3 – è grave

tipo 4 e 5 – sono di tipo moderato

La trasmissione è di tipo autosomico dominante, autosomico recessivo o recessivo legato all'X. La maggior parte dei casi è causata da mutazioni dominanti nei geni che codificano le due subunità del collagene di tipo 1, COL1A1 e COL1A2. Tuttavia, nei casi gravi, vi è una maggiore incidenza di mutazioni omozigoti recessive in una varietà di altri geni coinvolti nella produzione, elaborazione e trasporto del collagene di tipo 1 (Forlino et al., 1999).

I casi di OI grave vengono comunemente identificati in epoca prenatale, con esami di diagnostica per immagini che mostrano una crescita ridotta e arti corti, deformi o fratturati, mentre i casi di OI meno gravi vengono spesso identificati attraverso l'anamnesi familiare (in queste situazioni, un neonato non presenta solitamente caratteristiche evidenti o inequivocabili della malattia).

Sono state identificate più di 150 mutazioni del collagene nei pazienti affetti da OI. Le forme clinicamente più gravi del disturbo (OI di tipo II, III e IV) sono causate da difetti

strutturali del collagene di tipo I. La grande maggioranza (85%) di queste è costituita da sostituzioni di un residuo di glicina con un amminoacido con una catena laterale voluminosa, polare o carica. Il fenotipo molto lieve dell'OI di tipo I è generalmente causato dalla presenza di un allele COL1A1 nullo, dovuto a mutazioni che causano la terminazione prematura della catena (Forlino et al., 1999).

## **Il collagene**

Il collagene è la proteina più abbondante nella matrice extracellulare (MEC) degli organismi multicellulari e si trova soprattutto nel tessuto connettivo come pelle, tendini, ossa e legamenti. Nell'essere umano esistono 28 diversi tipi di collagene i più comuni sono di gran lunga quelli di tipo I-IV, con il tipo I che comprende oltre il 90% del collagene nel corpo umano. I diversi tipi di collagene sono codificati da 44 geni (Wu et al., 2023).

Essendo una molecola proteica, il collagene è costituito da amminoacidi, in cui la struttura primaria è data dalla sequenza glicina-prolina-X o glicina-X-idrossiprolina, dove X può essere uno qualsiasi degli altri 17 amminoacidi, e in un terzo dei casi è la glicina. Il collagene è costituito da tre catene avvolte che formano una tripla elica e la glicina essendo il più piccolo tra gli amminoacidi, consente alla catena di formare una struttura compatta e resistente. Il processo di sintesi avviene principalmente nei fibroblasti sia a livello intracellulare sia extracellulare e può subire modificazioni post-traduzionali in base al tipo di collagene.

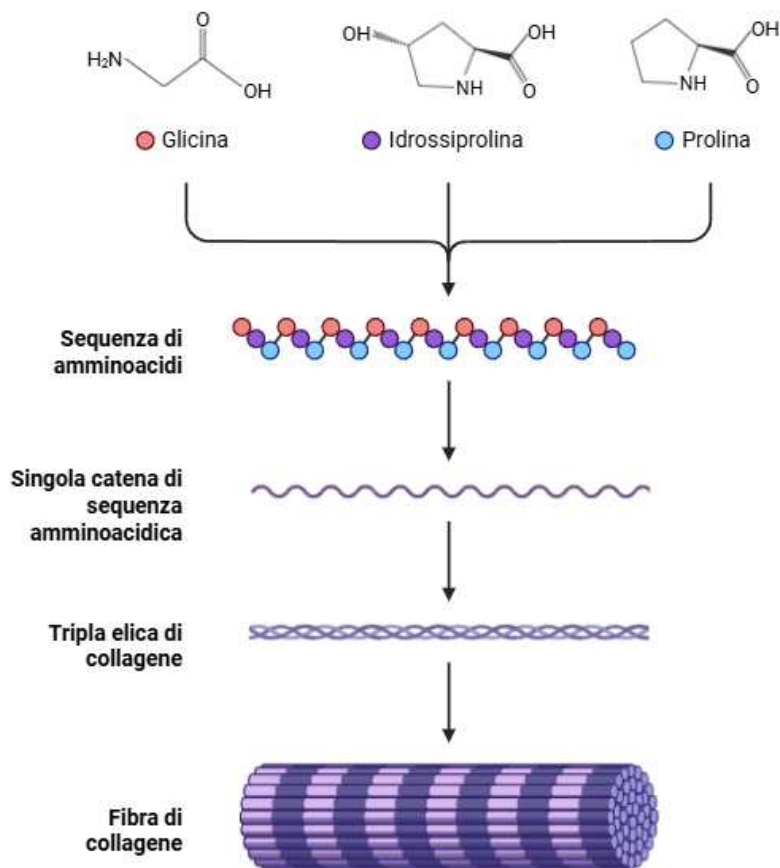


Figura 2 Formazione della fibra collagene (immagine creata su <https://www.biorender.com/>)

Come ogni percorso biochimico, vi sono diversi passaggi altamente regolati e controllati, ma in questi vi possono essere mutazioni genetiche che portano a errori di assemblaggio, modificazioni post-traduzionali o carenze nutrizionali che possono influenzare la funzione enzimatica.

La biosintesi del collagene inizia nel nucleo, con la trascrizione dell'mRNA dei geni che codificano le subunità  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  del collagene di tipo 1. L'mRNA si sposta nel citoplasma e interagisce con i ribosomi per la traduzione, portando alla produzione della catena pre-pro-polipeptidica (pre-pro- $\alpha 1$  e pre-pro- $\alpha 2$ ); questa si sposta poi nel reticolo endoplasmatico (RE) per la modificazione post-traduzionale in cui vengono apportate tre modifiche: rimozione del peptide segnale sull'estremità N-terminale, i residui di lisina e prolina ricevono ulteriori gruppi idrossilici e glicosilazione dei gruppi idrossilici sulla lisina con galattosio e glucosio  $\beta$ . Così, 2 catene  $\alpha 1$  e 1  $\alpha 2$  idrossilate e glicosilate si

assemblano attorcigliandosi in una tripla elica tramite una ripiegatura a cerniera. Si ha infine una molecola di pro-collagene con struttura a tripla elica costituita da tre eliche sinistrorse avvolte in una spirale destrorsa. Questa passa all'apparato di Golgi per le modifiche finali e assemblarsi in vescicole secretorie per entrare nello spazio extra-cellulare. Nello spazio extra-cellulare avviene la scissione del pro-peptide ad opera di enzimi come le peptidasi specifiche per il collagene, rimuovendo le estremità della molecola di pro-collagene, trasformandola in tropocollagene. Si assemblano le molecole di tropocollagene grazie all'azione di enzimi che operano sui residui di lisina e idrossilisina, formando una fibrilla di collagene (Wu et al., 2023).

La funzione principale del collagene è quella di dare supporto strutturale alla matrice e alle cellule in essa contenute, permette lo scambio di segnali biochimici, contribuendo così all'omeostasi delle cellule e della matrice stessa (Salamito et al., 2021). La MEC è composta da vari costituenti ed ha una complessa organizzazione e biosintesi.

Per una migliore comprensione delle diciture, viene riportata qui una tabella che illustra la nomenclatura a ciascun livello di formazione del collagene, dal gene alle macromolecole:

<b>Geni</b>	COLNAn dove N è il numero del tipo di collagene; n il numero della catena di collagene. E.g.: il gene umano COL5A1 codifica la catena collagene V $\alpha$ 1; COL4A2 codifica la catena collagene IV $\alpha$ 2	COL24A1
<b>Catene</b>	Le catene sono numerate con numeri arabi in base al loro pattern elettroforetico. Sono necessarie 3 catene $\alpha$ per formare una molecola di collagene (omotrimero, eterotrimero o ibrido). E.g.: l'omotrimero di collagene XV è scritto [ $\alpha$ 1(XV)] <sub>3</sub> ; l'eterotrimero di collagene I è scritto [ $\alpha$ 1(I)] <sub>2</sub> $\alpha$ 2(I) Le catene collagene $\alpha$ contengono domini numerati NC (domini non collageni o linkers)	[ $\alpha$ 1(XXIV)] <sub>3</sub>

	e COL (collageni), numerati da C-terminale a N-terminale	
<b>Collagene</b>	I tipi di collagene sono numerati con i numeri romani in base alla loro scoperta cronologica. Un tipo di collagene può comprendere una o diverse catene codificate su geni distinti. E.g.: il collagene XXVIII è codificato dal gene COL28A1 Il collagene è codificato da 6 diversi geni che danno origine a 3 collagene di tipo IV derivanti da 3 differenti assemblaggi della catena	COLXXIV Col24
<b>Aggregati</b>	I collageni formano aggregati sopramolecolari nello spazio extracellulare da sole o formando legami con altri collageni o con molecole della matrice extracellulare	fibrille

*Tabella 1 “The collagen lexicon”. La tabella mostra i diversi livelli di organizzazione del collagene dalla sintesi delle singole catene  $\alpha$  fino agli aggregati sopramolecolari che si trovano nello spazio extracellulare, e indica la nomenclatura comunemente utilizzata di ciascun livello di organizzazione del collagene. (Salamito et al., 2021)*

I componenti della MEC garantiscono ad essa di svolgere funzioni biologiche essenziali associate allo sviluppo, all'omeostasi, ai processi di riparazione e alle patologie. Perciò non deve stupire il fatto che dei 44 geni associati alla produzione e alla formazione del collagene, più della metà sia associata a collagenopatie. Le collagenopatie riguardano vari tessuti e organi, e generalmente vi è poca correlazione fra genotipo e fenotipo, a causa, in parte dell'eterogeneità clinica e la sovrapposizione fenotipica. Ciò può evidenziare una possibile incompleta conoscenza delle funzioni del collagene; perciò, per una più approfondita comprensione del suo funzionamento e della sua sintesi potrebbe essere utile un approccio integrato “omico” e l'utilizzo di vari organismi modello (Salamito et al., 2021).

La mutazione più comune è la sostituzione della glicina (Gly) nella sequenza ripetuta della tripla elica del collagene con un altro residuo amminoacidico. Le mutazioni

genetiche influenzano la formazione del pro-collagene, in cui il piccolo amminoacido glicina viene sostituito da amminoacidi più voluminosi che alterano la struttura a tripla elica del collagene (Wu et al., 2023). Ciò causa una destabilizzazione della catena e, di conseguenza, porta alla perdita di integrità della matrice extracellulare e all'alterazione delle proprietà funzionali delle cellule in essa contenute. Diverse mutazioni dei geni che codificano per il collagene provocano la produzione di molecole anomale che si ripiegano in maniera impropria. Questo, causa uno stress prolungato del reticolo endoplasmico (RE) e infine la morte cellulare. Perciò sono in corso studi farmacologici che mirano ai meccanismi di stress dell'RE. Al momento non esiste né una cura, né una terapia efficace, per questo è importante continuare un lavoro di ricerca, anche per comprendere meglio il ruolo e il funzionamento del collagene, dei geni e delle altre proteine con esso coinvolti.

## **Terapie**

Le attuali opzioni terapeutiche, mediche e ortopediche per l'OI, sono limitate e non sufficientemente efficaci per migliorare la bassa densità ossea, la fragilità ossea, la crescita e la mobilità degli individui affetti, creando la necessità di individuare agenti terapeutici alternativi. Sono state identificate otto nuove potenziali terapie per l'OI, che hanno dimostrato risultati promettenti su modelli cellulari e animali o nella pratica umana, ma sono ancora necessarie ulteriori ricerche.

Il trattamento con bifosfonati e il rodding delle ossa lunghe sono trattamenti frequentemente utilizzati nei bambini con OI e questi trattamenti potenzialmente modificano il fenotipo dell'OI in età adulta. Molti adulti con OI hanno assunto bifosfonati per diversi anni durante l'infanzia, e lo scheletro maturo potrebbe quindi aver accumulato bifosfonati, portando potenzialmente a una riduzione del rimodellamento osseo e a un aumento dell'accumulo di microfratture. D'altra parte, il trattamento con bifosfonati durante l'infanzia può migliorare la densità minerale ossea (*Bone Mineral Density*, BMD) nell'adulto e la prevenzione delle fratture durante l'infanzia e l'adolescenza può successivamente influenzare gli esiti scheletrici nella vita adulta a causa della riduzione delle deformità ossee e, possibilmente, dell'osteoartrite secondaria.

Gli adulti con OI continuano ad avere un rischio aumentato di frattura per tutta la vita e il tasso di frattura nelle donne in postmenopausa è quasi il doppio rispetto alle donne in

premenopausa. Le attuali opzioni terapeutiche possono ridurre il tasso di frattura, ma non ci sono prove conclusive disponibili che questi trattamenti siano efficaci nel prevenire le fratture negli adulti con OI.

Sono inoltre in fase di sperimentazione terapie con approcci diversificati fra loro che sfruttano tecniche quali il trapianto di cellule staminali, anticorpi o enzimi specifici.

Il trapianto di midollo osseo è una terapia promettente nei topi, negli adulti e nei bambini, riducendo il tasso di frattura con un effetto benefico sulle proprietà strutturali dell'osso.

Gli anticorpi anti-RANKL hanno generato risultati controversi relativi al programma terapeutico, da nessuna variazione nel tasso di frattura a un miglioramento dei marcatori di riassorbimento della densità minerale ossea e della formazione ossea, ma con effetti avversi correlati all'ipercalcemia (Dinulescu et al., 2024). Gli inibitori della sclerostina in modelli murini hanno dimostrato un aumento del tasso di formazione ossea e della massa ossea corticale trabecolare, e alcuni studi sull'uomo hanno mostrato un aumento dei biomarcatori e della BMD e la modulazione dei marcatori di riassorbimento. Il paratormone umano ricombinante e il TGF- $\beta$  hanno prodotto buoni risultati negli studi sull'uomo aumentando la BMD, a seconda del tipo di OI. La terapia genica, l'acido 4-fenilbutirrico e l'inibizione degli enzimi fosfatasi eIF2 $\alpha$  sono stati studiati solo in colture cellulari e modelli animali, con risultati promettenti (Dinulescu et al., 2024).

La maggior parte di esse ha mostrato risultati promettenti, ma sono necessarie ulteriori ricerche, soprattutto in campo pediatrico.

## **Modelli sperimentali**

Vari modelli animali di OI disponibili si sono dimostrati uno strumento unico per far luce su nuovi modulatori della determinazione del fenotipo per questa rara malattia eterogenea.

Fra questi è importante citare i numerosi modelli murini e di *zebrafish* (*D. rerio*) di OI classica. Questi modelli presentano sostituzioni di glicina o varianti del sito di splicing con trasmissione dominante nei geni endogeni del collagene, fornendo strumenti utili per analizzare ulteriormente la variabilità fenotipica dell'OI (Chen et al., 2014; Daley et al., 2010; Fisher et al., 2003; Forlino et al., 1999; Gistelinck et al., 2018). Questi modelli garantiscono un gran numero di organismi con genomi ben conosciuti e definiti, sia

consanguinei che non consanguinei. Inoltre, offrono la possibilità di valutare le proprietà geometriche e biomeccaniche delle ossa con sufficiente potenza statistica, cosa impossibile quando si utilizza l'osso del paziente. Tuttavia, il numero limitato di varianti di sequenza riprodotte nei modelli disponibili è il principale svantaggio che ne riduce la potenza.

Il pesce zebra è stato utilizzato come un efficiente modello vertebrato alternativo per lo studio delle malattie scheletriche umane, grazie alla sua facile manipolazione genetica, all'elevata fecondità, alla fecondazione esterna, alla trasparenza degli embrioni in rapido sviluppo e ai bassi costi di mantenimento. Inoltre, il pesce zebra condivide cellule scheletriche e tipi di ossificazione simili ai mammiferi. Inoltre, la capacità del pesce zebra adulto di rimodellare i tessuti scheletrici può essere sfruttata come uno strumento unico per studiare la formazione e la riparazione ossea. Infine, la permeabilità degli embrioni alle sostanze chimiche disciolte in acqua, insieme alla disponibilità di un gran numero di animali di piccole dimensioni, rende il pesce zebra un modello perfetto per lo screening ad alto rendimento di farmaci anabolizzanti ossei. Questa revisione si propone di discutere le tecniche che rendono il pesce zebra un potente modello per studiare le basi molecolari e fisiologiche dei disturbi scheletrici (Tonelli et al., 2020).

Recentemente, lo zebrafish è emerso come un organismo estremamente interessante per il pattern di espressione genica del pesce zebra durante la differenziazione delle cellule ossee e il tipo di ossificazione (Dietrich et al., 2021; Tonelli et al., 2020). La loro principale limitazione è associata alla composizione del collagene di tipo I poiché, a causa della duplicazione del gene *Col1a1* durante l'evoluzione, *D. rerio* presenta tre paraloghi *Col1* (Gistelinck et al., 2016). Infatti, mutanti di pesce zebra eterozigoti non mostrano alcuna anomalia scheletrica, probabilmente a causa della ridondanza funzionale tra le due catene.

Il modello di pesce zebra OI meglio caratterizzato, portatore di un difetto qualitativo, è il Chihuahua (*Chi/+*) (Fisher et al., 2003). *Chi/+* è eterozigote per una sostituzione di glicina basata sul sistema ereditario umano e sulla sequenza amminoacidica sistematica di modelli animali precedenti, mostrando un fenotipo OI grave e dominante che assomiglia all'OI di tipo III e si traduce in una riduzione della lunghezza corporea, fragilità ossea e mineralizzazione ritardata. Gli studi su questo modello hanno rivelato la formazione di

callo di frattura, deformazione delle costole e mineralizzazione eterogenea, in particolare lungo la colonna vertebrale (Gioia et al., 2017).

Ulteriori mutanti di zebrafish OI portatori di sostituzioni eterozigoti di glicina nel collagene di tipo I, ceppi mutanti sono stati caratterizzati come modelli validi per OI con lunghezza ridotta, deformità vertebrale, ipermineralizzazione e fratture frequenti (Gistelink et al., 2018).

Invece per quanto riguarda i modelli murini, questi tradizionalmente sono stati l'organismo modello più comune nella ricerca biomedica a causa della loro stretta relazione evolutiva con l'uomo, ma il loro utilizzo è caratterizzato rispetto ad altri modelli più semplici (come zebrafish), da: complessa generazione, difficile indagine delle fasi precoci dello sviluppo, restrizioni normative sull'allevamento e elevati costi di mantenimento (Tonelli et al., 2020).

Il primo modello murino knock-in per l'OI è stato il Col1a1+/G349C. Questo è stato creato tramite il sistema di ricombinazione Cre/lox. Ottenendo un fenotipo OI moderatamente grave da una sostituzione  $\alpha 1(I)$  Gly349  $\rightarrow$  Cys nel collagene di tipo I. Introducendo quattro cambiamenti a singolo nucleotide (nt) nell'esone 23 del collagene murino colla1 (la trasversione G $\rightarrow$ T che causa la malattia (nt 1546), una trasversione G $\rightarrow$ T adiacente (nt 1551) per generare un sito di scissione del ribozima GUC e due trasversioni (nt 1567 C $\rightarrow$ A e nt 1569 C $\rightarrow$ G) per causare una sostituzione Leu  $\rightarrow$  Met). Inoltre, è stata introdotta una cassetta di stop trascrizione/traduzione di 3,2 coppie di kilobasi nell'introne 22, fiancheggiata da siti di ricombinazione lox ripetuti direttamente. Dopo ricombinazione omologa in cellule staminali embrionali (ES), sono state ottenute due chimere maschili. Le chimere sono state accoppiate con femmine transgeniche che esprimevano la ricombinasi Cre per rimuovere la cassetta di stop da una porzione delle cellule della progenie. Per generare topi con piena espressione della mutazione Gly349  $\rightarrow$  Cys, questa prole è stata poi accoppiata con femmine wild-type. La colorazione scheletrica e l'istologia ossea della F2 hanno rivelato un fenotipo OI classico con deformità, fragilità, osteoporosi e struttura trabecolare disorganizzata. Sono stati designati come topi BrtlIV (Brittle IV). I topi BrtlIV presentano una variabilità fenotipica che va dalla letalità perinatale alla sopravvivenza a lungo termine con successo riproduttivo. La variabilità fenotipica non è associata a differenze nei livelli di espressione dell'allele mutante nell'RNA totale derivato da estratti tissutali. L'espressione della proteina mutante

è inoltre equivalente in diversi fenotipi. Pertanto, questi topi rappresentano un modello eccellente per la delineazione dei fattori modificatori che si ipotizza influenzino i fenotipi dell'OI umana. È simile la produzione del modello BrtlIII (Brittle III).

Il sistema di ricombinazione Cre/lox è una tecnologia importante per la modifica dell'espressione genica. La ricombinasi Cre, isolata dal batteriofago P1, è in grado di catalizzare la ricombinazione reciproca conservativa nelle cellule di mammifero. Cre riconosce una sequenza loxP di 34 bp e, in presenza di due siti loxP ripetuti direttamente, escinde la sequenza di DNA interposta. L'uso in vivo del sistema Cre/lox coinvolge sia topi che esprimono l'enzima Cre sia topi con siti loxP inseriti in un locus transgenico o endogeno di interesse selezionato. L'incrocio dei due ceppi genera una progenie in cui Cre è espresso e che scinde le sequenze tra i siti loxP. La selezione del promotore appropriato che controlla l'espressione di Cre consente la produzione di topi con modificazioni temporali e tessuto-specifiche.

Per la selezione positiva, un gene resistente alla neomicina (neo) è stato inserito all'interno della cassetta stop floxata. Il gene neo era sotto il controllo del promotore della fosfoglicerochinasi (PGK-neo) ed è stato inserito in orientamento inverso rispetto al gene endogeno colla1.

Le loro dimensioni sono circa il 50% di quelle dei fratelli normali fino a 6 settimane di età, dopodiché le loro dimensioni aumentano fino a circa l'80% del normale. È evidente una deformità della gabbia toracica. Inoltre, sia gli arti anteriori che quelli posteriori sono arcuati e più sottili rispetto ai compagni di cucciolata di controllo. Le radiografie mostrano una generale ipomineralizzazione dello scheletro, in particolare del cranio, un torace con apice stretto e base svasata e coste gracili. Il ramo dell'ischio appare svasato lateralmente.

L'analisi al microscopio ottico è stata eseguita su tessuti di topi BrtlIV di 2 mesi di età. La volta cranica era più sottile e scarsamente mineralizzata. I corpi vertebrali erano più disorganizzati e osteoporotici nei topi OI rispetto ai topi di controllo. L'analisi delle sezioni dei turbinati nasali dei topi mutanti ha mostrato la presenza di proliferazione osteoide e tessuto composto da fibroblasti piuttosto che da osso maturo. Erano presenti isole disorganizzate di formazione ossea nella mascella, nell'area intorno ai molari, rispetto al colletto organizzato di cellule che circonda i molari di tipo selvatico. La cavità pulpare dei molari appariva necrotica e infetta da batteri. La presenza di necrosi e tessuto

fibrotico nella cavità polmonare è ben descritta come una caratteristica comune associata alla dentinogenesi imperfecta nei pazienti con OI.

All'altro estremo dello spettro, il 40-60% dei mutanti F2 moriva entro poche ore dalla nascita per difficoltà respiratoria. Le dimensioni e il peso dei cuccioli erano simili a quelli dei fratelli normali. Le radiografie e la colorazione scheletrica hanno rivelato una gabbia toracica svasata con fratture multiple delle costole, fratture delle ossa lunghe, corpi vertebrali più corti e appiattiti e un bacino stretto. Inoltre, è stata notata una ridotta mineralizzazione della calotta cranica.

Il loro genoma contiene una singola copia per cellula di una mutazione che causa una tipica sostituzione di glicina, sotto il controllo del promotore endogeno e con trasmissione genetica dominante.

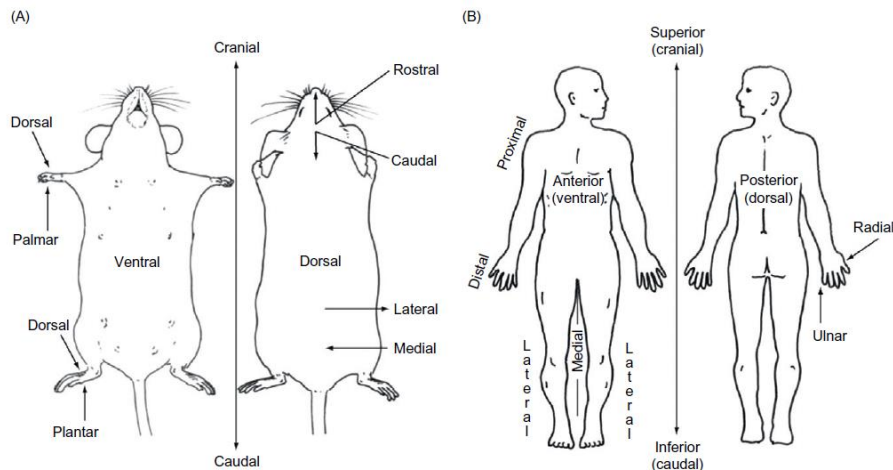
Sebbene la generazione di questi topi abbia confermato che i difetti del collagene causano la fragilità ossea, nessuno di questi topi è adatto per studi sulla fisiopatologia dell'OI o per lo sviluppo di approcci di terapia genica. Mancano della necessaria combinazione di un difetto molecolare caratteristico, livelli fisiologici di espressione di mRNA mutante e trasmissione genetica dominante (Forlino et al., 1999).

## **Anatomia e istologia comparata di fegato e rene nel topo**

### **Fegato**

I modelli murini, come già detto in precedenza, sono preziosi per la ricerca biomedica data la stretta relazione evolutiva con l'uomo e le conoscenze di anatomia comparata dei ricercatori sono necessarie per rapportare i dati sugli animali all'uomo. È importante che vi sia un'adeguata convalida e un'attenta traduzione dei dati per determinare in che misura le caratteristiche del sistema sperimentale (in questo caso, il fenotipo del roditore) corrispondano a quelle della malattia umana per avere dati veritieri e solidi. Inoltre, è necessario considerare nella progettazione della ricerca e nelle analisi gli ulteriori fattori che possono influire sui risultati per una migliore comparazione fra modello animale e modello umano oltre alla specie animale, quali le interazioni tra: il ceppo genetico del roditore, le manipolazioni genetiche, lo schema riproduttivo, il sesso, l'alloggio, la dieta,

l'età e gli organismi patogeni o commensali intercorrenti. (Treuting et al., 2017)  
 Il lavoro di ricerca è stato effettuato sul modello murino già citato Coll1a1+/G349C. Sono quindi da tenere a mente le basi di anatomia comparata fra specie murina e specie umana negli organi presi in considerazione: fegato e reni.



*Figura 3 Termini direzionali e piani di sezione anatomici. (A) roditore (topo). (B) Uomo. (Treuting et al., 2017)*

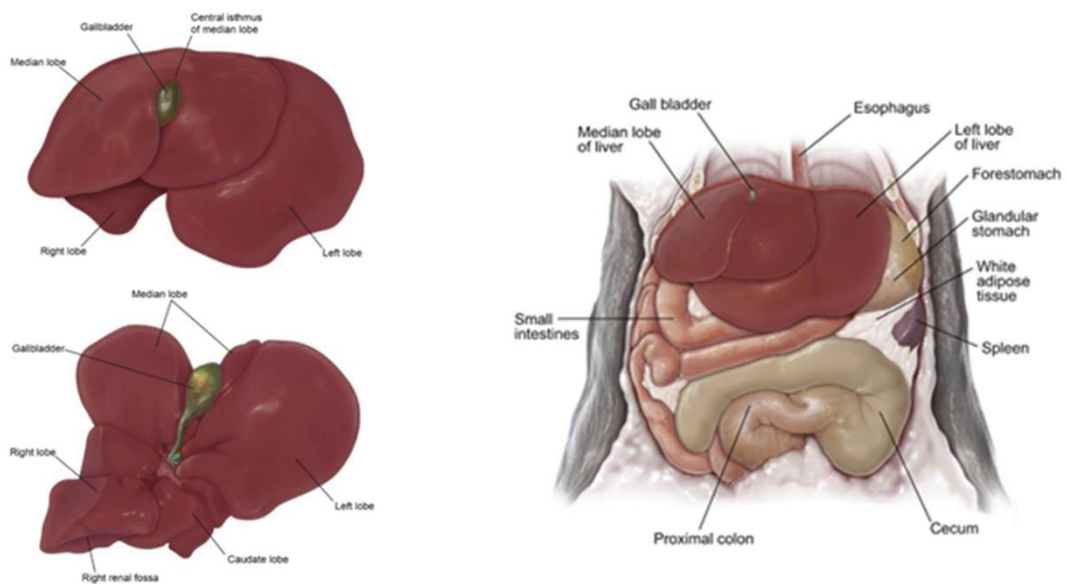
Il fegato è un centro regolatore per l'elaborazione dei nutrienti, la produzione di proteine, l'omeostasi energetica e la disintossicazione. I nutrienti vengono raccolti dal sangue che arriva dal tratto gastrointestinale attraverso la vena porta.

Il fegato dei roditori, che costituisce una percentuale maggiore della massa corporea totale rispetto a quello umano, si estende nello spazio sottodiaframmatico; al contrario, il fegato umano è limitato al quadrante superiore destro dell'addome. Il fegato dei roditori ha una superficie relativamente liscia e ininterrotta, mentre il fegato umano è attraversato e sospeso da spessi legamenti superficiali (Treuting et al., 2017). I lobuli funzionali sono altamente conservati nella struttura. In entrambe le specie, il sangue misto arterioso e venoso portale entra nel lobulo attraverso triadi portali (che in realtà sono tetradi costituite da arteriole, venule, dotti biliari e vasi linfatici spesso trascurati). Nutrienti e macromolecole vengono liberamente scambiati tra epatociti e plasma attraverso sinusoidi rivestiti da endotelio fenestrato, mentre le cellule residenti, tra cui cellule stellate epatiche, macrofagi delle cellule di Küpffer e cellule T e NK, mantengono la sorveglianza

immunitaria. La funzione fisiologica tra le tre specie è simile, sebbene alcune differenze chiave si riflettano a livello microscopico.

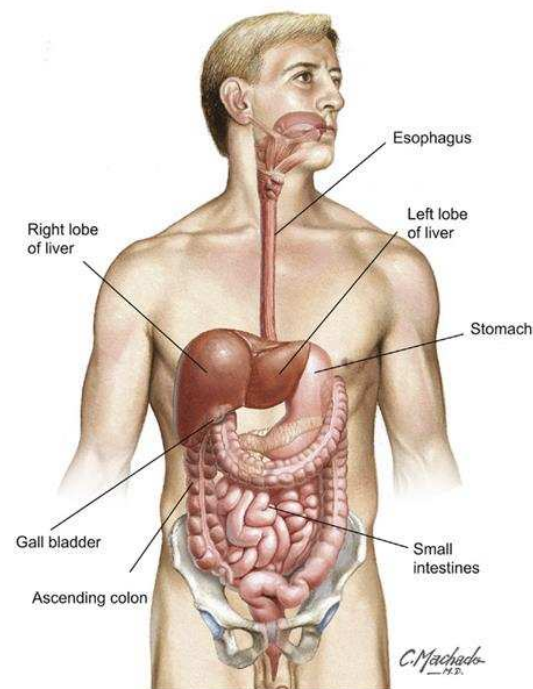
A livello strutturale, gli epatociti dei roditori possono presentarsi come un campo omogeneo, soprattutto nelle aree mediozonali e centrolobulari del topo, mentre il fegato umano presenta distinti cordoni epatocitari spessi una sola cellula, dalla triade portale alla vena centrolobulare. Rispetto all'uomo, il fegato dei topi presenta collagene e altri tessuti connettivi molto meno evidenti. In risposta a lesioni croniche, i cordoni a ponte di collagene e la rigenerazione nodulare caratteristica della cirrosi sono facilmente evidenti nel fegato umano ma raramente si verificano nel topo (Treuting et al., 2017).

Nel complesso, le somiglianze nella struttura e nella funzione tra le due specie superano di gran lunga le differenze e i roditori rimangono i modelli di laboratorio più ampiamente applicati di danno e malattia epatobiliare umana. Il peso del fegato nei topi varia a seconda della specie e del ceppo ma in genere rientra nell'intervallo di 2-3 g (3-5% del peso corporeo, PC). I quattro lobi del fegato dei roditori sono destro, mediano, sinistro e caudato.



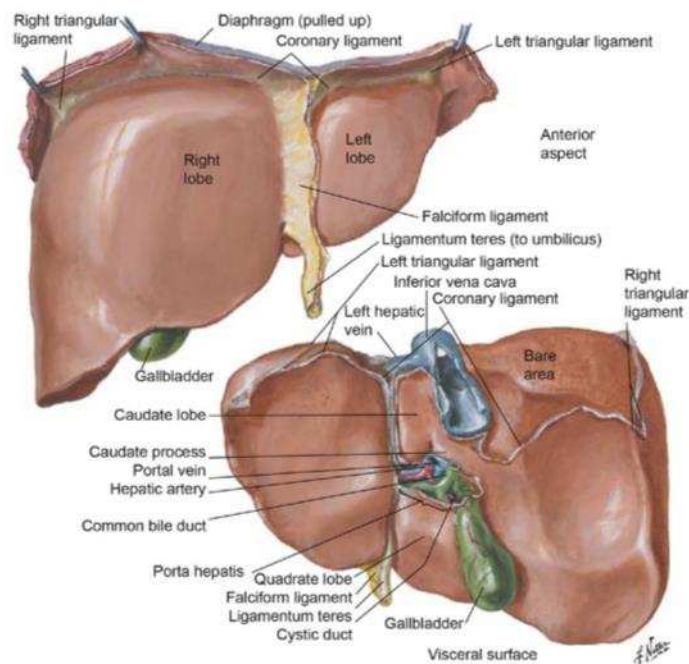
*Figura 4 Anatomia macroscopica del fegato di topo. (Treuting et al., 2017)*

Il fegato umano pesa circa 1500 g e costituisce circa il 2% del peso corporeo totale, il che lo rende la ghiandola più grande del corpo. Si trova sotto il diaframma, sul lato destro della cavità addominale (figura). Presenta quattro lobi non completamente separati.



*Figura 5 Anatomia del sistema gastro-intestinale umana (Treuting et al., 2017)*

Sulla superficie anteriore si trovano il lobo destro, più grande, e il lobo sinistro, più piccolo; sulla superficie viscerale, sono esposti il lobo caudato superiore e il lobo quadrato inferiore, situati tra il lobo destro e quello sinistro (figura). A separare il lobo quadrato dal lobo caudato è l'ilo epatico, la regione in cui la vena porta e l'arteria epatica entrano nel fegato e da cui esce il dotto epatico. Le vene epatiche, che trasportano il sangue in uscita dal fegato, emergono dal lobo caudato e si svuotano quasi direttamente nella vena cava inferiore. Questa inserzione delle vene epatiche alla vena cava inferiore contribuisce a garantire la posizione del fegato nella cavità addominale superiore.

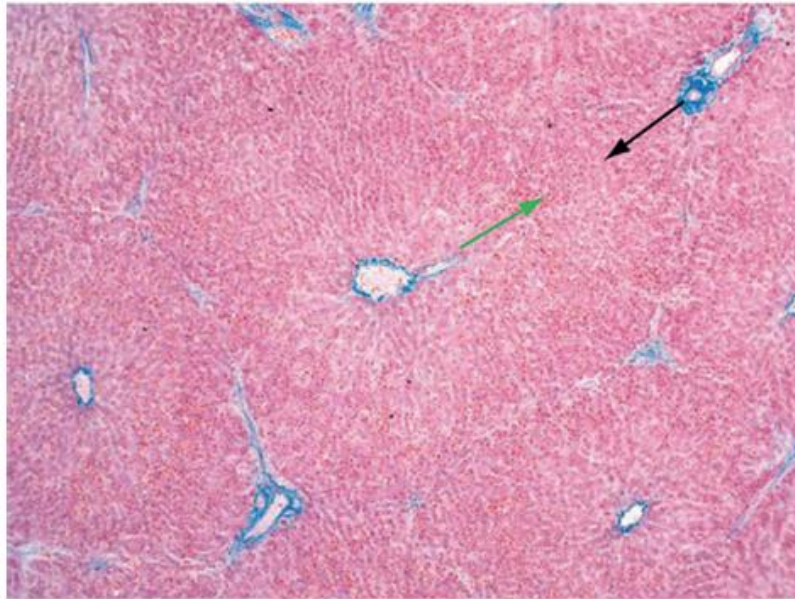


*Figura 6 Anatomia macroscopica del fegato umano (Treuting et al., 2017)*

Il fegato umano è circondato da una capsula collagena, nota come capsula di Glisson, e il tessuto connettivo capsulare si continua con lo stroma interno del fegato a livello dell'ilo. La cistifellea è presente sulla superficie inferiore del lobo epatico destro.

L'architettura microscopica epatica in entrambe le specie può essere descritta nel contesto dei "lobuli epatici classici". Si tratta di strutture poligonali con tratti portaliferi periferici che circoscrivono una vena centrale. Si stima che il fegato umano contenga circa 1 milione di lobuli epatici classici.

Le placche di epatociti sono supportate da reticolina e da altri elementi stromali e sembrano irradiarsi dall'arteria centrale; sangue e bile viaggiano in direzioni opposte. Il sangue misto arterioso e venoso si muove dalle regioni portaliferi alla vena centrale attraverso i sinusoidi, mentre la bile secreta nei canalicoli viene diretta alle regioni portaliferi da microvilli epatocellulari specializzati. I cordoni o placche epatiche sono costituiti da colonne di epatociti che si estendono dalla regione porta alla vena centrale (Treuting et al., 2017).



*Figura 7 Lobuli e cordoni epatici umani sono evidenziati i lobuli delimitati da tessuto connettivo (blu). La freccia nera mostra la direzione del flusso sanguigno; la freccia verde mostra la direzione del flusso biliare (Treuting et al., 2017).*

Gli spazi tra le placche contengono i sinusoidi epatici, o "capillari" del fegato. Le pareti dei sinusoidi sono ridotte al minimo, con fenestrature e ampie discontinuità tra le cellule endoteliali. Tra il sinusoidi e la cellula epatica si trova lo spazio pericapillare di Disse, dove il plasma sanguigno è a diretto contatto con gli epatociti, consentendo il libero scambio di macromolecole. L'architettura lobulare epatica è simile in tutte le specie, con supporto stromale da parte della reticolina e flusso biliare controcorrente rispetto al flusso sanguigno. A causa delle dimensioni ridotte e della ridotta quantità di tessuto connettivo, alcune regioni portal dei roditori possono essere trascurate nelle sezioni istologiche. Le strutture portal epatiche umane sono supportate da una maggiore quantità di collagene, nonché da sottili fibre reticolari (costituite da collagene di tipo III), che formano una rete lassa a supporto dei sinusoidi. Grazie alle loro dimensioni e al tessuto connettivo associato, le regioni portal del fegato umano sono facilmente visibili anche a basso ingrandimento.

Le placche epatiche monocellulari che si estendono per tutta la lunghezza del lobulo sono tipiche nel ratto e nell'uomo, mentre nei topi gli epatociti possono gonfiarsi e comprimersi dopo un pasto a causa dell'imbibizione di acqua associata al glicogeno. Ciò si traduce nella perdita di una demarcazione netta del cordone nel topo, specialmente nelle regioni

medio-zonali e centrolobulari. Infatti, cordoni epatici monocellulari chiaramente delineati per tutta la lunghezza del lobulo possono suggerire anoressia o malattia cronica nel fegato del topo. Sebbene la maggior parte degli epatociti abbia un solo nucleo, non è raro trovare cellule binucleate e/o poliploidi in un dato campo in ambedue le specie (Treuting et al., 2017).

In tutte e tre le specie, i macrofagi residenti, noti come cellule di Küpffer, si proiettano nel lume sinusoidale. Costituiscono uno dei principali filtri per il particolato estraneo che entra nel fegato e costituiscono circa il 15% delle cellule epatiche totali. Anche le cellule T e le cellule NK-T sono abbondanti nel fegato.

I canalicoli biliari sono minuscoli spazi tubulari tra le cellule epatiche in tutte e tre le specie e ricevono la bile secreta dagli epatociti. Le loro pareti sono rivestite da membrane plasmatiche epatocitarie polarizzate arricchite di esportatori biliari e microvilli che dirigono le secrezioni verso i tratti di efflusso portale.

Le giunzioni strette impediscono la fuoriuscita di bile nel parenchima epatico. I canalicoli che attraversano il lobulo si diramano in minuscoli dotti chiamati canali di Hering, che trasportano la bile ai dotti biliari situati nei tratti portalari alla periferia del lobulo, in controcorrente rispetto al flusso sanguigno. I canali di Hering sono anche la sede di cellule progenitrici indistinte o "staminali epatiche" che possono proliferare in risposta a lesioni. I dotti biliari si uniscono in dotti biliari interlobulari progressivamente più grandi, formando infine i dotti epatici sinistro e destro che sfociano nella cistifellea del topo e dell'uomo.

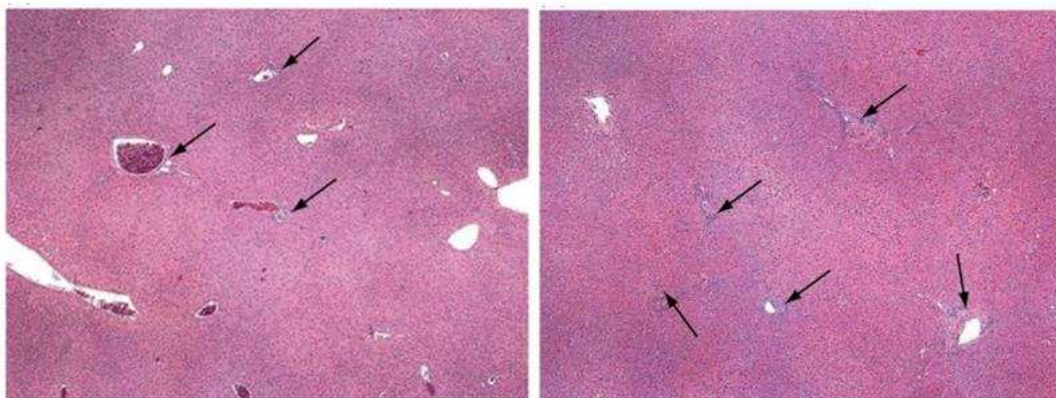


Fig. A

Fig. B

Figura 8 (A) Istologia del fegato murino. (B) Istologia del fegato umano (Treuting et al., 2017)

## Rene

I reni fanno parte sia del sistema urinario sia del sistema endocrino e sono coinvolti in una varietà di processi fisiologici, tra cui l'osmoregolazione, la regolazione della pressione sanguigna e del volume, la stimolazione della produzione di globuli rossi, l'assorbimento del calcio, il metabolismo delle tossine e l'escrezione. Il nefrone è l'unità funzionale del rene ed è composto dal glomerulo e dal tubulo renale. I prodotti del rene includono l'urina, l'enzima renina e gli ormoni eritropoietina e calcitriolo (che è la forma attiva della vitamina D). Queste comuni funzioni renali nei mammiferi, così come la struttura macroscopica e istologica complessiva, sono piuttosto simili tra roditori ed esseri umani. Le differenze di specie nella fisiologia renale si riflettono nel rapporto e nel numero dei nefroni, e anche nella morfologia dei fasci vascolari, delle papille renali e della midollare. I roditori, soprattutto i maschi, producono urina altamente concentrata con un elevato contenuto proteico. Il dimorfismo sessuale può essere presente nel rene dei roditori. Esistono anche differenze ultrastrutturali tra roditori ed esseri umani. Le dimensioni dei reni, così come le risposte a vari farmaci e composti, possono variare significativamente a seconda del sesso del roditore all'interno e tra i ceppi (Treuting et al., 2017).

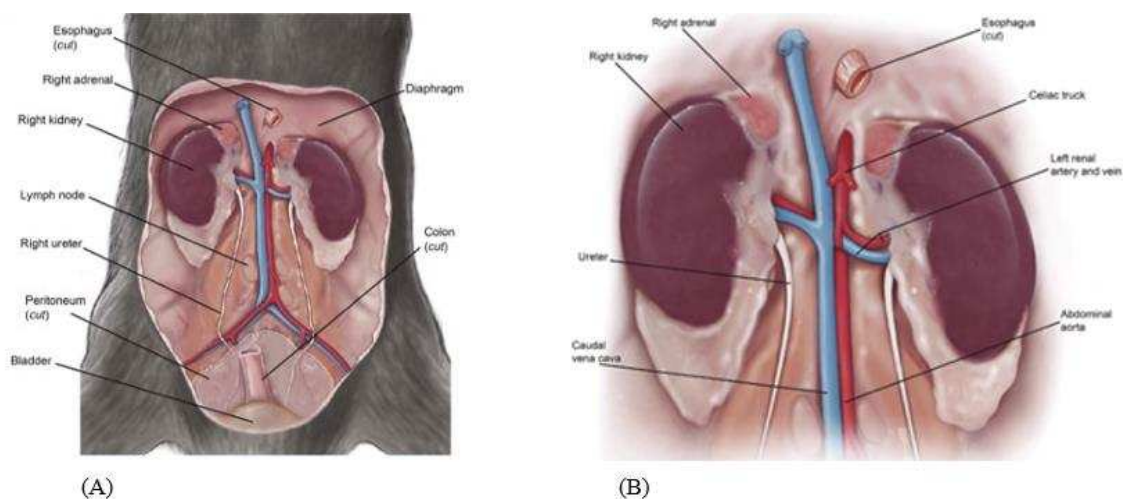
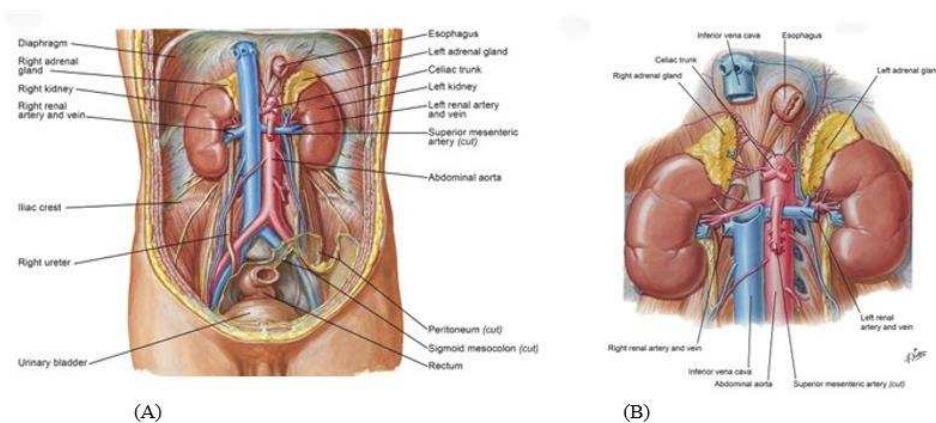


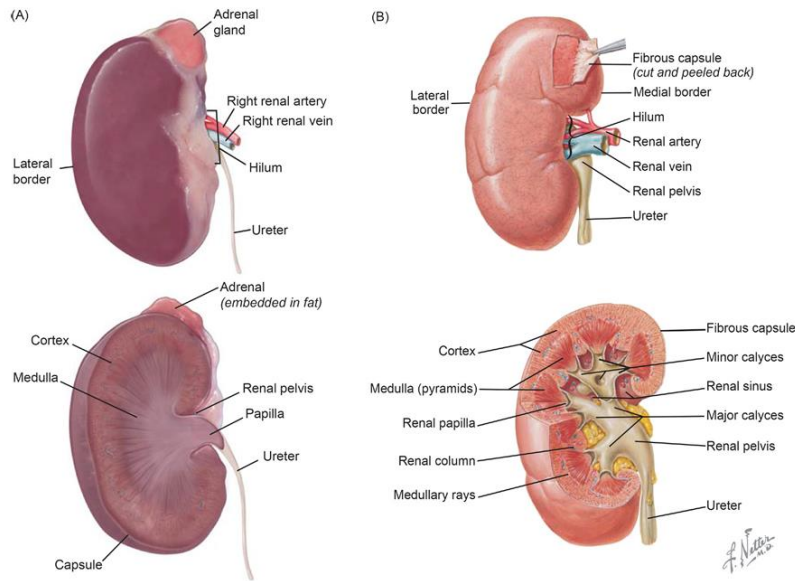
Figura 9 Anatomia regionale del topo. (A) Spazio retroperitoneale. (B) Reni e tessuti molli perirenali (Treuting et al., 2017).

Il rene del roditore è situato retroperitonealmente, spesso circondato da tessuto adiposo bianco con sacche di tessuto adiposo bruno all'interno della pelvi e occasionalmente intorno alla capsula renale. Entrambi i reni sono situati nella parte superiore dell'addome medio. Il rene destro è relativamente craniale, adiacente al lobo destro del fegato; il sinistro è più caudale. Anche il rene umano si trova retroperitonealmente nella parte posteriore dell'addome e, come il rene dei roditori, è circondato da tessuto adiposo. Il polo superiore del rene umano si trova a livello del bordo superiore della dodicesima costa toracica, mentre il polo inferiore si estende fino alla terza costa lombare. Il rene destro è solitamente leggermente più basso (inferiore/caudale) rispetto al sinistro.



*Figura 10 Anatomia regionale umana. (A) Spazio retroperitoneale. (B) Reni e tessuti molli perirenali (Netter's Essential Histology, Ovale, W.K. e Nahirney, J.C., 2008).*

Il rene dei roditori è di colore mogano, liscio, a forma di fagiolo e relativamente sottile in senso dorsoventrale. I roditori maschi hanno reni relativamente più grandi delle femmine e il peso dei reni varia tra i ceppi consanguinei. Il rene umano è di colore bruno-rossastro e solitamente ha una superficie liscia. Similmente ai roditori, il rene umano maschio è leggermente più grande di quello femminile. In entrambe le specie, vasi sanguigni, linfatici e nervi entrano ed escono dal rene a livello dell'ilo renale, che contiene il seno renale, uno spazio pieno di grasso occupato dai calici renali (Treuting et al., 2017).



*Figura 11 Rene destro (A) topo. Rene destro (B) uomo (Netter's Essential Histology, Ovale, W.K. e Nahirney, J.C., 2008)*

I reni dei roditori sono unilobari (unipiramidali) con una sola papilla che si estende in profondità nella pelvi renale. Le corticali presentano labirinti corticali a forma di cono e raggi midollari che si estendono dalla midollare esterna, che è divisa in una fascia esterna e una interna. La porzione più interna della midollare è la papilla renale, che si estende nella pelvi renale e nell'uretere.

I reni umani sono multipapillari (multipiramidali) con 7-9 papille. Ogni papilla è circondata da un calice minore. Due o tre calici minori si uniscono per formare i calici maggiori, che a loro volta si aprono nella pelvi renale.

L'afflusso di sangue al rene è simile nelle due specie.

Nei topi e nell'uomo, il nefrone è composto dal glomerulo, dal tubulo prossimale (contorto e retto), dalle anse discendente e ascendente di Henle, dal segmento retto, dalla macula densa e dal tubulo distale contorto. I nefroni sono classificati in base alla posizione nella corteccia: superficiali o iuxtamidollari nei topi; e superficiali, mediocorticali o iuxtamidollari nell'uomo.

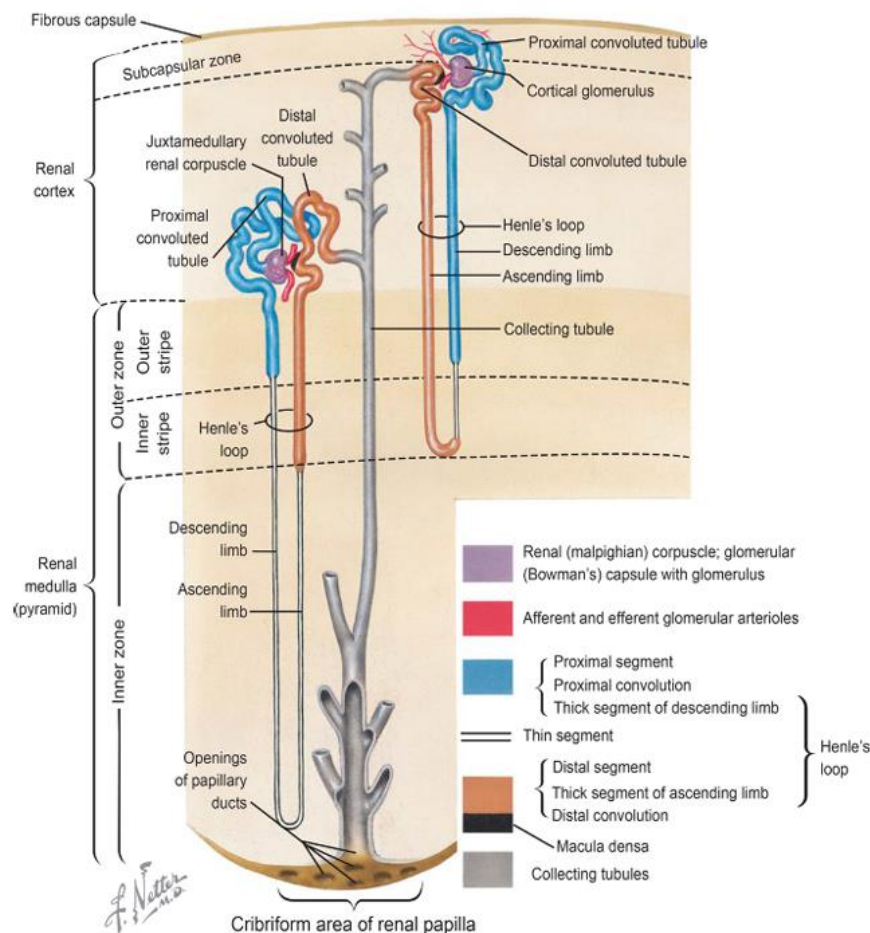
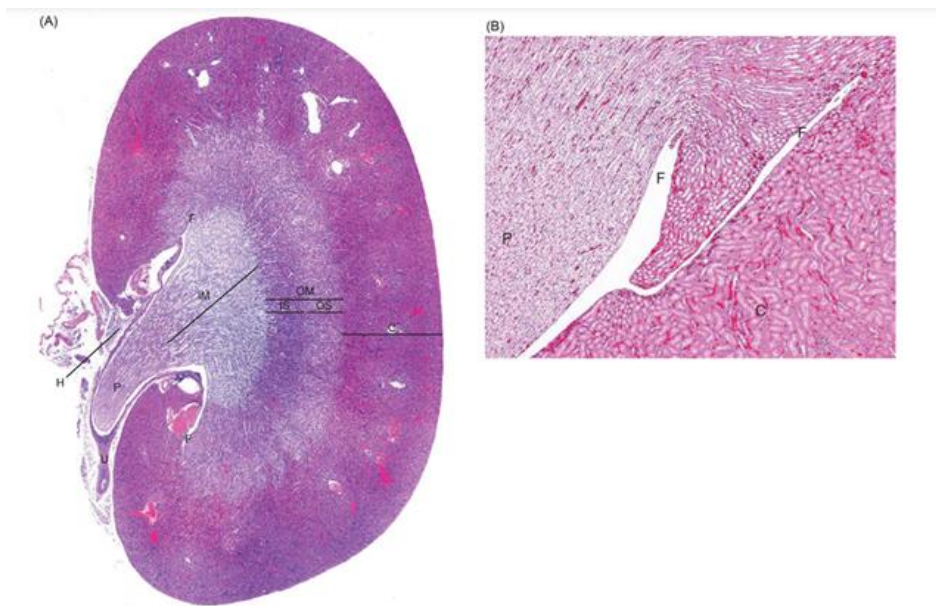


Figura 12 Diagramma di un nefrone (Netter's Essential Histology, Ovalle, W.K. e Nahirney, J.C., 2008)

Un ulteriore schema di classificazione dei nefroni è basato sulla lunghezza dell'ansa di Henle, descritta come a segmento corto o a segmento lungo. I roditori hanno più nefroni a segmento lungo che a segmento corto (3:1), mentre gli esseri umani hanno più segmenti ad ansa corta che a segmento lungo (7:1). Questa differenza spiega la maggiore capacità di concentrazione complessiva del rene dei roditori, che produce urina con elevato peso specifico (compreso tra 1,030 e 1,060 g/ml) e proteinuria, più marcata nei maschi (Treuting et al., 2017).

Nei topi sono presenti circa 14.000 nefroni mentre negli esseri umani ne sono presenti circa 1 milione per rene. Nelle due specie, il numero non cambia con l'età, sebbene i glomeruli aumentino di dimensioni e la loro densità diminuisca dalle zone esterne a quelle interne della corteccia.

Il tessuto renale dei roditori assomiglia molto a quello di un essere umano giovane, con una corteccia corticale (la zona sottocapsulare priva di glomeruli) relativamente sottile e dimensioni glomerulari significativamente inferiori (media 73,4 e 90  $\mu\text{m}$  nei topi contro 200  $\mu\text{m}$  negli esseri umani adulti). In entrambe le specie, i glomeruli iuxtamidollari possono apparire più grandi di quelli della corteccia superficiale. Il corpuscolo glomerulare comprende una rete di capillari circondati dalla capsula di Bowman.



*Figura 13 Rene di topo ingrandito. (A) La corteccia (C), la midollare (M) e l'ilo (H) sono facilmente distinguibili. Una singola papilla (P) si estende in profondità nella pelvi renale. Le porzioni superiori delle pelvi presentano pieghe chiamate fornici (F), che aumentano la superficie. L'ilo renale (H) contiene abbondante grasso bruno. Sono indicati la corteccia (C), la midollare esterna (OM), la striscia interna (IS), la striscia esterna (OS), la midollare interna (IM) e l'uretere (U) (Treuting et al., 2017). (B) Ingrandimento elevato che dimostra la relazione con il fornice (F), la corteccia (C) e la papilla (P).*

La rete vascolare glomerulare è supportata da cellule mioepiteliali immerse nella matrice extracellulare. La superficie luminale dei capillari è rivestita da un endotelio fenestrato specializzato, mentre la superficie urinaria è ricoperta da cellule epiteliali viscerali, con procedimenti a forma di piede.

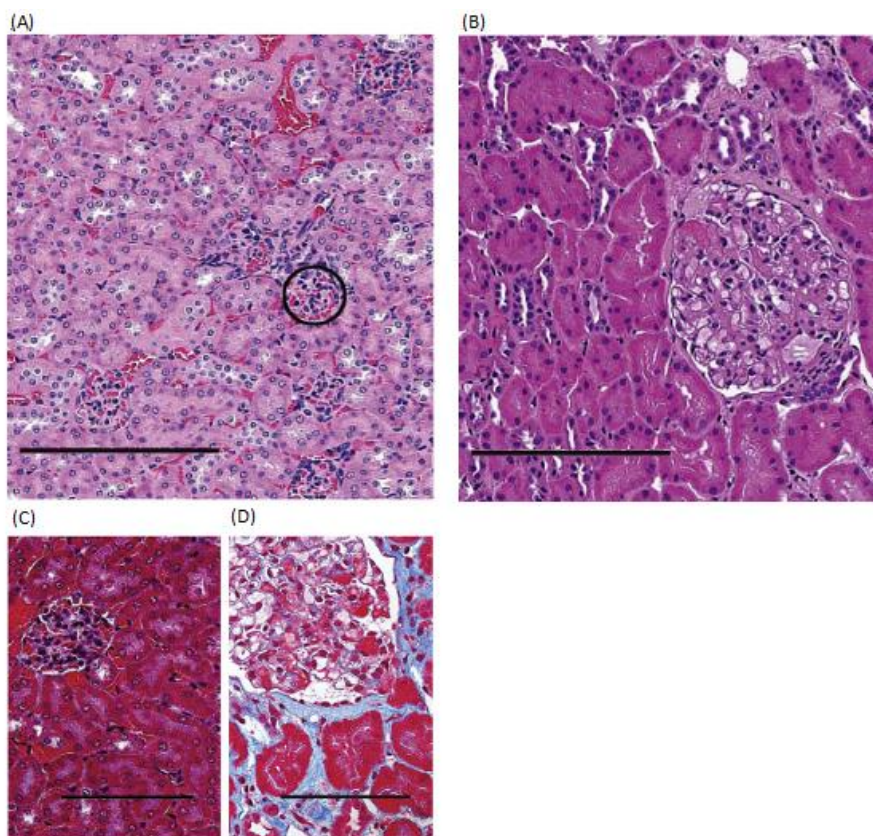
La membrana basale glomerulare è presente tra le cellule endoteliali e i podociti in entrambe le specie.

I roditori mostrano un dimorfismo sessuale anche all'interno dei glomeruli, che dipende dal ceppo e dall'età. Nei roditori maschi, l'epitelio parietale della capsula di Bowman può essere cuboide, a differenza dell'epitelio squamoso solitamente piatto negli esseri umani e nelle roditrici femmine.

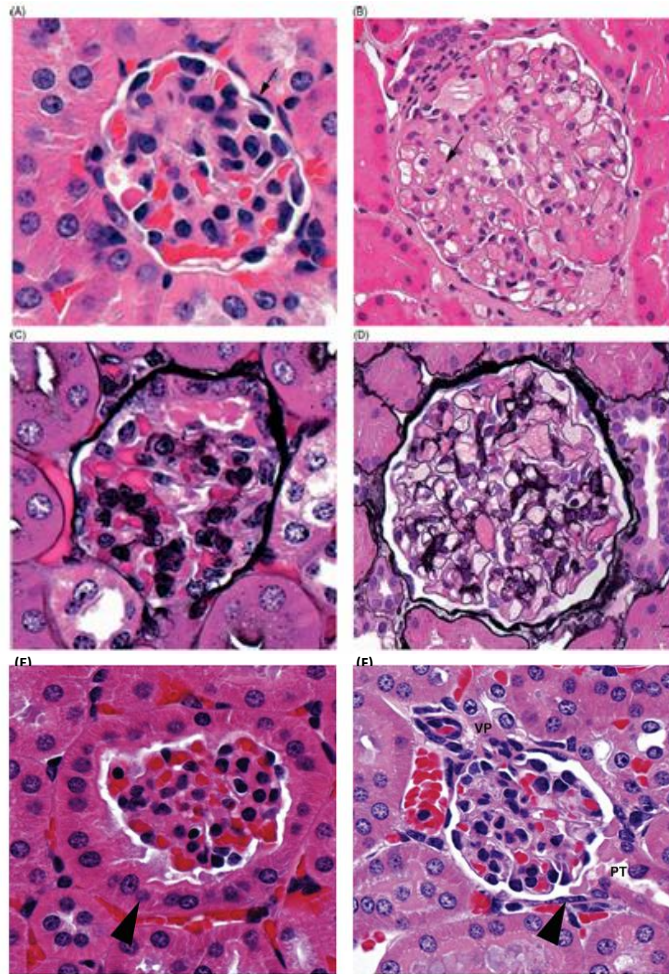
Le caratteristiche ultrastrutturali del glomerulo di topo e uomo sono per lo più simili, con la principale differenza nello spessore della membrana basale glomerulare.

La membrana basale dei capillari glomerulari è composta da tre strati: lamina rara interna, lamina densa e lamina rara esterna. La lamina densa è più spessa negli esseri umani che nei topi, con conseguente spessore medio della membrana basale di 320-340 nm, rispetto agli 80-200 nm nei topi. Nei topi, gli strati della membrana basale sono più distintamente visibili rispetto agli esseri umani (Treuting et al., 2017).

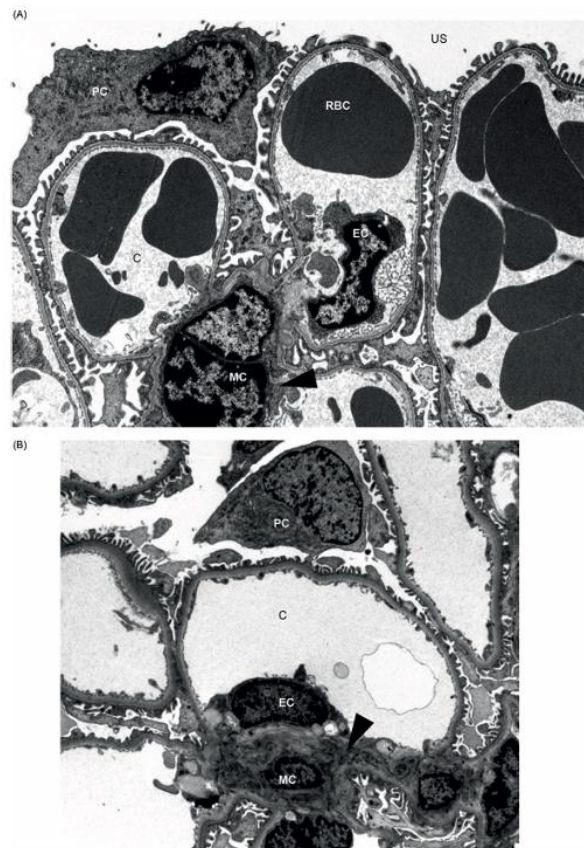
Altre caratteristiche ultrastrutturali, come l'endotelio fenestrato e gli spazi tra i processi podocitari glomerulari, sono simili nelle due specie.



*Figura 14 Corteccia renale. (A) Topo. (B) Umano. (C) Topo. Rene colorato con tricromica di Masson. Il rene ha poco tessuto connettivo interstiziale, con solo le aree perivascolari e la capsula che si colorano di un blu intenso. (D) Umano. Biopsia della corteccia renale colorata con tricromica di Masson. Come nella maggior parte dei tessuti umani, il tessuto connettivo parenchimale di supporto (blu) è più prominente rispetto al topo. Le figure A e B hanno lo stesso ingrandimento; barra della scala = 250  $\mu$ m; le figure D ed E hanno lo stesso ingrandimento; barra della scala = 50  $\mu$ m.*

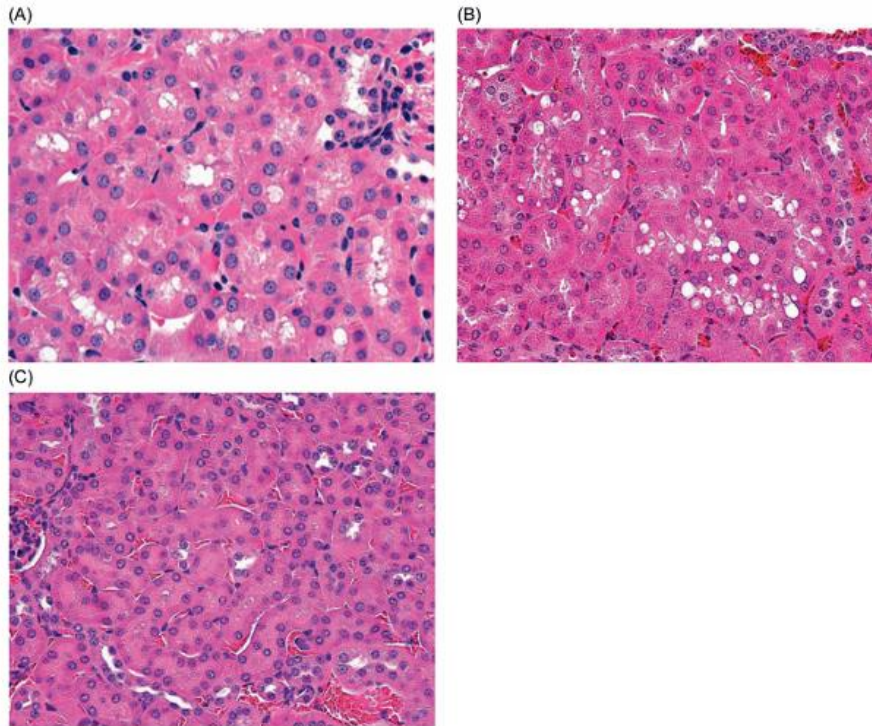


*Figura 15 Glomeruli renali. (A) Topo. Capsula di Bowman (freccia). (B) Uomo. (C) Topo maschio colorato con metenamina argento di Jones per evidenziare la membrana basale glomerulare. Notare l'epitelio parietale cuboidale basso. (D) Uomo colorato con metenamina argento di Jones per evidenziare le membrane basali glomerulare e tubulare. (Fig. E-F) Dimorfismo sessuale nei glomeruli dei roditori. (E) Topo maschio. PCT (punta di freccia). (F) Topo femmina. L'epitelio parietale (punta di freccia). Sono indicati il tubulo prossimale (PT) e il polo vascolare (VP).*



*Figura 16 Ultrastruttura glomerulare. (A) Roditore (topo) (8000×). Numerose anse capillari (C) sono in sezione e contengono globuli rossi (RBC) supportati dalla matrice mesangiale (punta di freccia) e dalle cellule (MC). Fenestrazioni nell'endotelio e fessure di filtrazione nei processi podocitari dei podociti (PC), insieme alla membrana basale glomerulare, filtrano il sangue e l'ultrafiltrato si raccoglie nello spazio urinario (US). (B) Umano (3600×). I lumi capillari (C) sono rivestiti da cellule endoteliali, con i nuclei delle cellule endoteliali (EC) solitamente situati sul mesangio e il citoplasma piatto fenestrato che riveste i lumi capillari. Le cellule mesangiali (MC) sono immerse nella matrice extracellulare (punta di freccia) e forniscono supporto ai capillari glomerulari. I podociti (PC) sono situati all'esterno delle pareti capillari e inviano i loro processi podali ai capillari adiacenti. (Holly Predd Carlson, Università di Washington)*

I labirinti corticali dei roditori contengono principalmente tubuli contorti prossimali (PCT) che terminano in corrispondenza dei raggi midollari.



*Figura 17 Dimorfismo sessuale della corteccia. (A) Topo maschio giovane. (B) Topo maschio anziano. Le cellule tubulari corticali esterne sono variamente vacuolate. I vacuoli sono tipicamente piccoli, discreti e incolori, compatibili con un accumulo di lipidi microvescicolari. (C) Topo femmina. Questo è l'aspetto tipico della corteccia di una femmina o di un maschio giovane (Treuting et al., 2017).*

Nella midollare, i tubuli sono la pars recta, il ramo discendente retto e le sottili anse di Henle. L'ansa di Henle è composta da quattro parti: (1) ramo discendente spesso, (2) ramo discendente sottile, (3) ramo ascendente sottile e (4) ramo ascendente spesso. I tubuli contorti distali sono presenti all'interno dei raggi midollari, dove si svuotano nei dotti collettori e drenano nella midollare, e possono essere individuati istologicamente grazie alla loro colorazione pallida e all'assenza di orletto a spazzola. L'epitelio tubulare prossimale è simile nelle due specie, con il PCT e i segmenti retti divisi in base alla capacità funzionale in tre segmenti: P1, P2 e P3. Questi segmenti sono noti anche come S1, S2 e S3 e possono essere identificati mediante microscopia istochimica e ultrastrutturale.

Al microscopio ottico, l'orletto a spazzola del tubulo contorto prossimale presenta un orletto a spazzola prominente e relativamente spesso che varia di spessore nei segmenti. Nei roditori, questi segmenti presentano dimorfismo sessuale; ad esempio, i ratti maschi

presentano un reticolo endoplasmatico liscio più esteso in P1 e P2, che può essere apprezzato ultrastrutturalmente. Analogamente, i mitocondri di P2 nei topi maschi sono più grandi e più elettrone-lucenti, e presentano più vacuoli autofagici. Queste differenze di sesso nella struttura riflettono differenze funzionali

Le cellule epiteliali da cuboidi a colonnari del tubulo prossimale sono intensamente eosinofile con citoplasma granulare dovuto all'elevato numero di mitocondri e un denso orletto a spazzola PAS-positivo. Nei roditori, il tubulo contorto distale non presenta l'orletto a spazzola prominente del PCT, ma potrebbe essere altrimenti difficile da distinguere nelle sezioni colorate con ematossilina ed etossilina. Il dimorfismo sessuale dei glomeruli e dei tubuli dei roditori è presente sia a livello ottico che al microscopio elettronico. Ad esempio, le cellule tubulari corticali esterne del topo maschio sono variabilmente vacuolate. Questi vacuoli sono tipicamente piccoli, discreti e incolore, compatibili con l'accumulo di lipidi microvescicolari. Al contrario, le femmine di roditori in genere non presentano vacuolazione delle cellule tubulari prossimali e le cellule delle femmine. Nell'uomo, piccoli vacuoli apicali citoplasmatici e granuli sono presenti prevalentemente nelle cellule epiteliali tubulari prossimali e corrispondono a un apparato endocito-lisosomiale ben sviluppato.

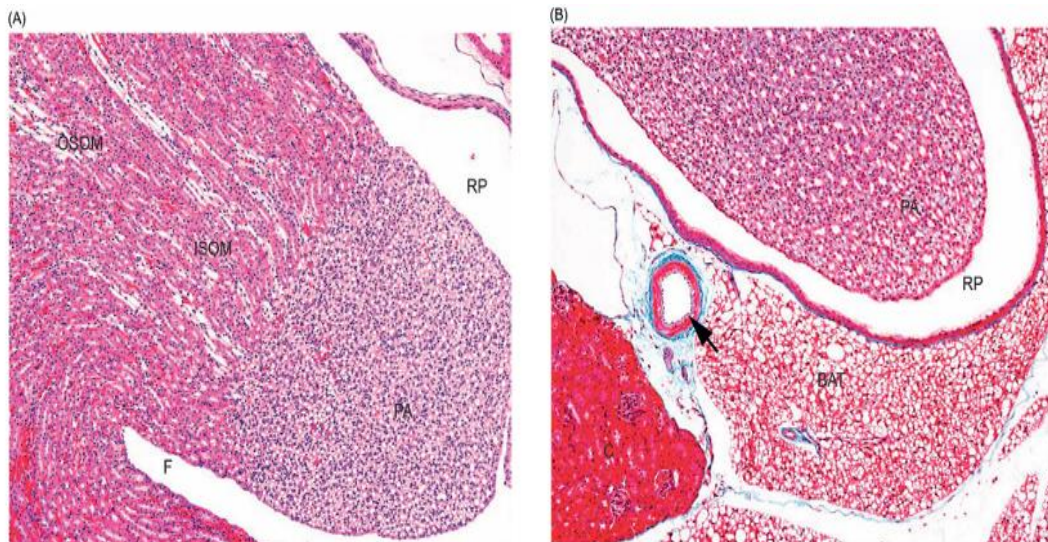
Nella midollare esterna dei roditori, le sottili anse sono avvolte da grandi fasci vascolari, che contribuiscono alla profonda capacità di concentrazione del nefrone dei roditori.

Il ramo spesso discendente del tubulo distale rientra nella corteccia a livello dell'apparato iuxtaglomerulare (AGJ). L'AGJ è composto dalle arteriole afferenti ed efferenti, dalla macula densa e dalle cellule mesangiali extraglomerulari, ed è situato al polo vascolare del corpuscolo renale.

Nell'uomo e nei topi, la midollare è divisa in zone interna ed esterna, e la zona esterna è divisa in strisce interne ed esterne.

All'interno dei raggi midollari, i tubuli contorti distali si uniscono ai tubuli collettori, che poi si uniscono in dotti collettori più grandi a livello delle papille renali, formando la midollare interna. La midollare interna e la striscia interna della midollare esterna contengono dotti collettori, sottili rami ascendenti e discendenti del tubulo distale. La striscia esterna della midollare esterna contiene segmenti terminali del tubulo prossimale, spessi rami ascendenti del tubulo distale e tubuli collettori. Proporzionalmente, i roditori hanno aumentato i nefroni lunghi, con quelli che si estendono in profondità.

La papilla dei roditori si estende ben oltre la pelvi renale, a differenza delle papille umane. La pelvi renale in tutte e due le specie è rivestita da urotelio, simile a quello presente nell'uretere e nella vescica.



*Figura 18 Papille e ilo. (A) Roditore (topo). Si noti la striscia esterna della midollare esterna (OSOM), la striscia interna della midollare esterna (ISOM), la midollare interna e le anse di Henle (branche discendenti spesse e sottili e bricche ascendenti sottili e spesse). Sono indicati il fornice (F), le papille renali (PA) e la pelvi renale (RP). (B) Ilo renale di roditore (topo). Colorazione tricromica di Mason. La singola papilla renale (PA) dei topi si estende ben oltre la pelvi (RP). Il seno renale contiene grasso bruno (BF) e un'arteria renale (freccia). È indicata la corteccia (C) (Treuting et al., 2017).*

### **Anticorpi primari utilizzati**

Negli studi di immunoistochimica sono stati usati marker per l'autofagia, danno al DNA e apoptosi. L'autofagia è un processo cellulare altamente conservato che svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare degradando proteine mal ripiegate o aggregate, nella rimozione di organelli danneggiati, come mitocondri, reticolo endoplasmatico e perossisomi, e nell'eliminazione di patogeni intracellulari (Gómez-Virgilio et al., 2022). Utilizza la via lisosomiale e in condizioni di stress (mancanza di nutrienti o fattori trofici) funziona come un meccanismo di sopravvivenza che consente

la generazione di precursori metabolici per il corretto funzionamento delle cellule fino a quando i nutrienti non sono disponibili.

Una volta formato, l'autofagosoma si fonde con il lisosoma per degradare il carico. La linea autofagica è mediata da geni ATG conservati e svolgono diverse funzioni fisiologicamente essenziali nel traffico di membrana e nelle vie di segnalazione.

La formazione dell'autofagosoma è avviata da un complesso proteico, che nei mammiferi può essere attivato solo in assenza di segnalazione da parte della chinasi che rileva i nutrienti. LC3-I è distribuito uniformemente nella cellula quando i livelli di autofagia sono bassi, mentre all'induzione dell'autofagia, la lipidazione di LC3 provoca la sua rilocalizzazione nell'autofagosoma.

L'autofagia è stata identificata come un meccanismo protettivo nella cartilagine normale contro lo stress ossidativo e altri fenotipi correlati all'invecchiamento. La sua perdita correlata all'età è collegata alla morte cellulare e all'osteoartrite. È stato dimostrato che la carenza di autofagia specifica della cartilagine contribuisce al ritardo della crescita. Inoltre, nella popolazione senile, la ridotta attività autofagica degli osteociti con l'invecchiamento è proposta come causa sottostante della perdita ossea.

L'autofagia contribuisce all'efficace controllo di qualità degli organelli e delle proteine citosoliche negli epatociti. Di conseguenza, disturbi o malfunzionamenti dell'autofagia sono associati a sintomi patologici e malattie del fegato (Gómez-Virgilio et al., 2022).

Il meccanismo di vacuolazione per la rimozione delle proteine ripiegate in modo anomalo avviene sia all'interno sia all'esterno del reticolo endoplasmatico. Il ripiegamento anomalo delle proteine sembra essere ciò che innesca l'autofagia.

## **P62**

P62, chiamato anche sequestosoma 1 (p62/SQSTM1), è una proteina di 440 amminoacidi e contiene molteplici domini, che sono alla base dei suoi diversi ruoli funzionali, possiede due segnali di localizzazione nucleare (NLS) e un segnale di esportazione anucleare (NES) (Gómez-Virgilio et al., 2022).

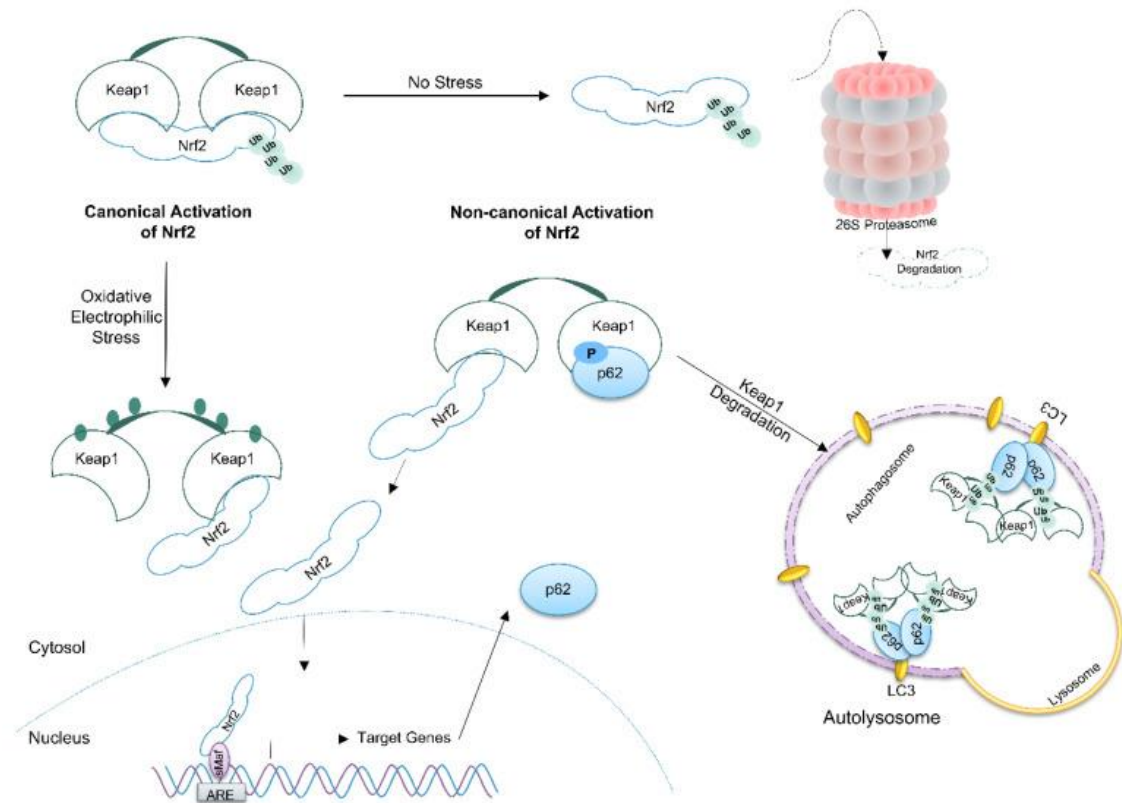


Figura 19 P62 pathway (Henning et al., 2021).

È in grado di legare l'ubiquitina e regola l'attivazione della via di segnalazione del fattore nucleare kappa-B (NF- $\kappa$ B). La proteina funziona come una proteina di supporto/adattamento in concerto con il fattore 6 associato al recettore del TNF per mediare l'attivazione di NF- $\kappa$ B in risposta a segnali a monte. Per questo gene sono state identificate varianti di trascrizione con splicing alternativo che codificano per la stessa isoforma o per isoforme diverse.

Viene utilizzato come marker per autofagia, morte cellulare e per marcare gli organelli (autofagosoma).

Ha la capacità di oligomerizzazione e ciò consente a p62 di formare strutture filamentose che sequestrano il carico ubiquitinato per la degradazione autofagica attraverso il suo dominio UBA e domini in grado di legarsi agli autofagosomi che presentano la catena leggera 3 (LC3) della proteina associata ai microtubuli. I domini PB1 e ZZ regolano anche l'interazione tra p62 e LC3 modulando l'esposizione di specifiche sequenze. Mentre la regione di legame Raptor collega p62 alla soppressione dell'autofagia (mediata da mTORC1). Questa interazione è regolata dal trasporto nucleocitoplasmatico tramite due

segnali di localizzazione nucleare (NLS1/2 e NES), consentendo a p62 di modulare sia l'autofagia citoplasmatica che la proteostasi nucleare (ossia regolazione della qualità e del turnover proteico intracellulare). Gli eventi di fosforilazione nei motivi NLS migliorano l'importazione nucleare, regolando dinamicamente la distribuzione subcellulare di p62. Attraverso queste interazioni coordinate tra domini, p62 integra la segnalazione dello stress (NF- $\kappa$ B, Nrf2), mTORC1 e i sistemi di controllo della qualità delle proteine. La sua plasticità strutturale consente il reclutamento, dipendente dal contesto, di chinasi, ubiquitina ligasi e chaperoni per mantenere l'omeostasi cellulare, con una disregolazione che contribuisce al cancro, alla neurodegenerazione e ai disturbi metabolici (Gómez-Virgilio et al., 2022).

P62 è una proteina di supporto che lega l'ubiquitina ed è un classico recettore selettivo dell'autofagia, ma ha anche ruoli nel sistema ubiquitina-proteasoma, nel metabolismo cellulare, nella segnalazione e nell'apoptosi. Inoltre, p62 colocalizza con aggregati proteici ubiquitinati in molte malattie neurodegenerative e proteinopatie del fegato (Gómez-Virgilio et al., 2022).

Le modificazioni post-traduzionali (PTM) regolano i molteplici ruoli di p62, controllando la separazione di fase di p62, il reclutamento del carico, le interazioni di segnalazione e l'efficienza della degradazione autofagica. La disregolazione delle PTM di p62 è strettamente correlata all'insorgenza e allo sviluppo di malattie umane (malattie neurodegenerative e alcuni tumori).

Nei topi *Brtl*, l'autofagia è sovraregolata a causa dello stress del reticolo endoplasmatico (RE) causato sua volta dall'accumulo di collagene I mal ripiegato (Marini et al., 2017). Questo stress è visibile al microscopio elettronico, dalla forma anomala (gonfia) del RE.

### **LC3B**

La Catena Leggera 3 (LC3), è un marcatore di autofagia ed è stato originariamente identificato come una subunità delle proteine associate ai microtubuli 1A e 1B e successivamente si è scoperto che contiene una somiglianza con la proteina di lievito critica per l'autofagia. Esistono tre isoforme umane di LC3 (LC3A, LC3B e LC3C) che subiscono modifiche post-traduzionali durante l'autofagia, subisce una coniugazione post-traduzionale ubiquitino-simile, attraverso il quale le LC3 vengono coniugate

covalentemente alla fosfatidiletanolamina (PE) e quindi si localizzano selettivamente sulla membrana autofagosomiale. Questa conversione di LC3 da una forma non coniugata (LC3-I) a una forma coniugata a PE (LC3-II) è fondamentale per la formazione degli autofagosomi.

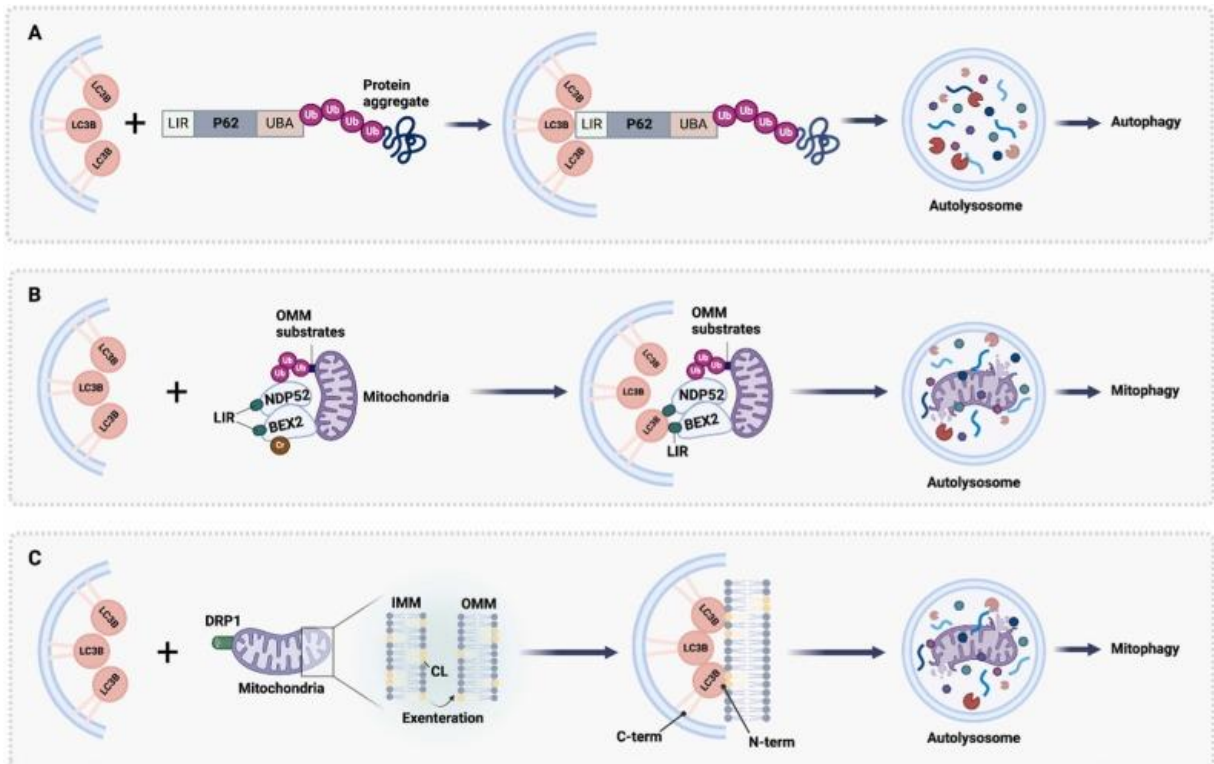


Figura 20 LC3 pathway (Yan Chen et al., 2025).

La scissione di LC3 al terminale carbossilico immediatamente dopo la sintesi produce la forma citosolica LC3-I. Durante l'autofagia, LC3-I viene convertito in LC3-II attraverso la lipidazione da parte di un sistema simile all'ubiquitina che coinvolge Atg7 e Atg3, consentendo a LC3 di associarsi alle vescicole autofagiche. Sia la presenza di LC3 negli autofagosomi, sia la conversione di LC3 nella forma migrante inferiore, LC3-II, sono utilizzate come indicatori di autofagia.

Inoltre, LC3B agisce come proteina legante l'RNA e un fattore di decadimento dell'mRNA necessario per un'autofagia efficiente. Negli eucarioti, gli mRNA sono presenti come complessi con una varietà di proteine leganti l'RNA (RBP), formando complessi di ribonucleoproteine messaggere (mRNP). Le mRNP sono soggette a rimodellamento dinamico durante la loro vita, con cambiamenti nella composizione delle

RBP, nella struttura secondaria o terziaria, modifiche post-traduzionali delle RBP e modifiche nella sequenza dell'RNA. Le RBP associate determinano il destino degli mRNA, tra cui l'esportazione dal nucleo al citoplasma, la localizzazione intracellulare, l'efficienza di traduzione nel citoplasma e la stabilità degli mRNA. In accordo con la regolazione dell'espressione genica nei multistrati da parte delle RBP, diversi studi recenti hanno evidenziato l'interazione tra RBP e autofagia. Ad esempio, alcune RBP influenzano lo splicing alternativo, la stabilità o la traduzione di un sottoinsieme di mRNA ATG, influenzando di conseguenza l'autofagia. Inoltre, il legame diretto di un vault RNA (un piccolo RNA non codificante) a p62 (un noto recettore dell'autofagia) interferisce con la multimerizzazione di p62, controllando l'autofagia (Hwang et al., 2022).

LC3 è abbondante nel nucleo, nonostante funzioni principalmente nel citoplasma, dove si formano gli autofagosomi e gli autolisosomi. In condizioni di elevata disponibilità di nutrienti, LC3 è distribuita in forma acetilata sia nel nucleo che nel citoplasma. La deprivazione di nutrienti promuove la redistribuzione di LC3 dal nucleo al citoplasma. Questa redistribuzione dipende dalla deacetilazione della proteina da parte della deacetilasi nucleare attivata SIRT1 e dall'associazione della proteina con il suo partner di interazione nucleare (TP53INP2/DOR). Ancora più importante, la deacetilazione è necessaria anche affinché LC3 si leghi ad ATG7 per la successiva lipidizzazione. Pertanto, i risultati implicano che il pool nucleare di LC3 sia la fonte primaria di LC3 coniugato alla membrana e che una regolazione della deacetilazione e della traslocazione nucleocitoplasmatica di LC3 sia coinvolta nell'induzione dell'autofagia (Huang & Liu, 2015).

LC3B avvia la biogenesi dell'autofagosoma dopo essere stato coniugato alla membrana attraverso interazioni con ATG7 e altri effettori autofagici. Sebbene siano stati confermati molteplici meccanismi che innescano l'autofagia.

La fosforilazione dell'LC3B consente il trasporto efficiente degli autofagosomi, basato sui microtubuli, verso l'area perinucleare, facilitando così il contatto degli autofagosomi con i lisosomi. In assenza di fosforilazione di LC3B, gli autofagosomi subiscono un trasporto aberrante, che include un aumento dello spostamento verso la periferia cellulare, con conseguente riduzione della colocalizzazione autofagosoma-lisosoma. Pertanto, la fosforilazione di LC3B modula il trasporto direzionale degli autofagosomi verso i

lisosomi nell'area perinucleare, un evento cruciale per garantire la degradazione autofagica del carico.

LC3B interagisce con varie proteine presenti sulle membrane del fagoforo e degli autofagosomi per supportare fasi chiave del processo di autofagia, incluso il legame ai recettori del carico per guidare il reclutamento del carico. LC3B, legata al membro esterno dell'autofagosoma, regola anche l'associazione degli autofagosomi con le proteine che mediano il trasporto dell'autofagosoma e la fusione autofagosoma-lisosoma (Nieto-Torre et al., 2021).

Alterazioni nei pathway mediati da LC3B possono peggiorare lo stress intracellulare e compromettere la vitalità o la differenziazione degli osteoblasti.

### **PARP1**

Le poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) sono una famiglia di enzimi correlati che condividono la capacità di catalizzare il trasferimento dell'ADP-ribosio alle proteine bersaglio. Le PARP svolgono un ruolo importante in vari processi cellulari, tra cui la modulazione della struttura della cromatina, la trascrizione, la replicazione, la ricombinazione e la riparazione del DNA. È stato dimostrato che l'iperattivazione di PARP determina uno specifico percorso di morte cellulare programmata che coinvolge la deplezione di NAD<sup>+</sup>/ATP, l'attivazione della mu-calpain, la perdita del potenziale di membrana mitocondriale e il rilascio del fattore che induce l'apoptosi. Esistono 18 isoforme.

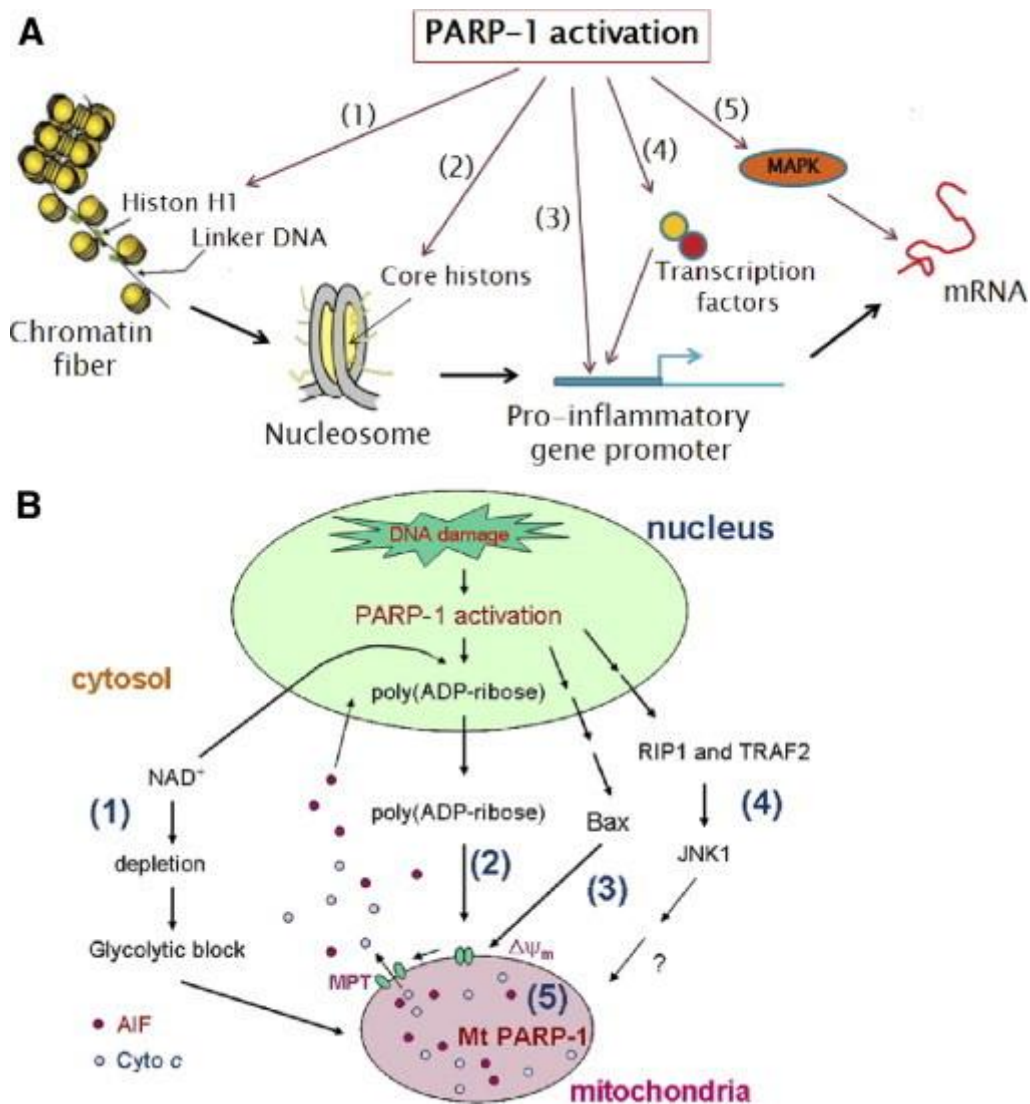


Figura 21 PARP1 pathway (Xueqing Ba et al., 2011).

L'isoforma PARP1 è nota soprattutto per il loro coinvolgimento nei processi di riparazione del DNA, e svolge un ruolo importante in diversi processi cellulari, tra cui la proliferazione e la morte cellulare. Sono stati definiti diversi substrati cellulari per PARP, e la maggior parte di queste proteine sono proteine nucleari coinvolte nel metabolismo degli acidi nucleici, nella modulazione della struttura della cromatina, nella sintesi e nella riparazione del DNA. PARP si automodifica anche in presenza di rotture del filamento di DNA ed è uno dei principali accettori di poliADP-ribosio in vivo. PARP1 è il primo e meglio caratterizzato membro della famiglia PARP.

La prova di un ruolo importante di PARP nella riparazione del DNA deriva dalla scoperta che gli agenti che danneggiano il DNA e il danno al DNA indotto dalle radiazioni causano

un aumento dell'attività di PARP. È stato anche scoperto che l'accumulo di lesioni al DNA determina un aumento significativo dei livelli di PARP nelle cellule. PARP è coinvolta nella riparazione per escissione di basi (BER) in risposta alle rotture del DNA a singolo filamento (SSB) ed è un componente del complesso BER, costituito dalla DNA ligasi III, dalla DNA polimerasi beta e dalla proteina XRCC1. Nei sistemi cell-free, è stato dimostrato che l'enzima PARP non modificato si lega saldamente alle rotture del filamento di DNA e, in seguito all'auto-poli-ADP-ribosilazione, viene rilasciato, consentendo all'enzima di riparazione di accedere al DNA danneggiato.

PARP1 svolge un ruolo nella riparazione per escissione dei nucleotidi (NER), poiché i processi NER vengono ridotti con l'inibizione di PARP1. Sia BER che NER sono vie chiave che consentono la riparazione del danno al DNA che può essere causato da alcuni agenti alchilanti e chemioterapici dimostrati con modelli sperimentali (Morales et al., 2016).

Questa proteina può essere scissa da molte caspasi in vitro ed è uno dei principali bersagli di scissione della caspasi-3 in vivo. PARP aiuta le cellule a mantenere la loro vitalità; la scissione di PARP facilita il disassemblaggio cellulare e funge da marcatore delle cellule in fase di apoptosi.

Non esistono studi che confermino i livelli di espressione di PARP1 in modelli di OI. Sebbene lo stress del reticolo endoplasmatico e le ROS possano innescare queste vie, il loro ruolo è stato solo estrapolato da altre collagenopatie.

### **P53**

L'anticorpo P53 (DO-1) è un anticorpo monoclonale IgG2a a catena leggera kappa è utilizzato per rilevare la P53. Consente di rilevare sia il tipo selvaggio che alcune forme mutanti della proteina.

La proteina P53 è una proteina soppressore del tumore che svolge un ruolo essenziale nel mantenimento dell'integrità genomica, regolando il ciclo cellulare e inducendo l'apoptosi in risposta ai danni al DNA e ad altri stress cellulari. È codificata dal gene TP53, situato sul cromosoma 17 nell'uomo. Sebbene sia localizzata principalmente nel nucleo, la P53 può essere trasportata nel citoplasma dal suo regolatore negativo MDM2, un'ubiquitina ligasi E3 che indirizza la P53 alla degradazione proteosomica. Le modifiche post-

traduzionali, come la fosforilazione e l'acetilazione, modulano l'attività di P53 e gli anticorpi anti-P53 fosfo-specifici possono distinguere tra gli stati fosforilati e non fosforilati. Le mutazioni nel dominio che lega il DNA di P53 sono implicate in diversi tumori umani, rendendo l'anticorpo P53 un reagente essenziale negli studi che riguardano il controllo del ciclo cellulare e l'apoptosi.

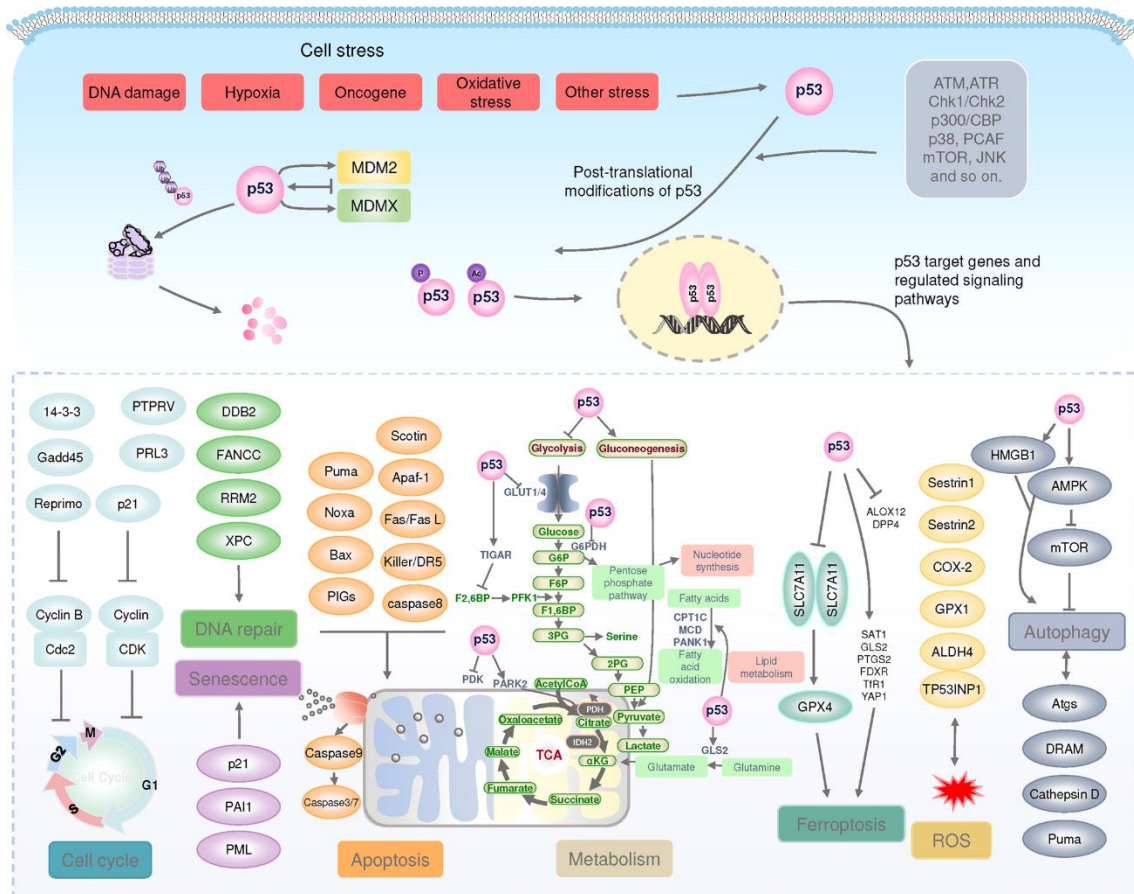


Figura 22 P53 pathway (Haolan Wang et al., 2023).

P53 è attivato da una miriade di segnali di stress e guida specifiche risposte cellulari a seconda della natura dello stress, del tipo di cellula e del contesto cellulare. diversi segnali di stress che vanno dal danno al DNA, all'ipossia, all'attivazione di oncogeni e alla deprivazione di nutrienti. Tra le funzioni di p53 più studiate vi è la sua capacità di ritardare il ciclo cellulare, riparare le lesioni del DNA e indurre l'apoptosi, tutte funzioni ampiamente mediate dalla regolazione trascrizionale diretta di specifici geni bersaglio (Kasthuber & Lowe, 2017).

Modificazioni come fosforilazione, ubiquitinazione, acetilazione, sumoilazione e glicosilazione, possono regolare la stabilità proteica di p53, la localizzazione subcellulare e l'attività trascrizionale. Nelle cellule non sottoposte a stress, p53 viene mantenuto a bassi livelli fisiologici principalmente dall'azione dell'ubiquitina ligasi MDM2, che promuove l'esportazione e la degradazione nucleare di p53. In questo modo, l'inibizione di MDM2 da parte di diversi effettori determina la stabilizzazione di p53. Questo è il caso del soppressore tumorale ARF, che risponde all'attivazione aberrante dell'oncogene e inibisce direttamente MDM2. p53 stabilizzato e attivato è in grado di attivare trascrizionalmente MDM2, stabilendo un feedback negativo per limitare l'attività di p53 una volta superato lo stress. Molte modificazioni post-traduzionali, oltre all'ubiquitinazione e alla deubiquitinazione, sono anch'esse responsabili della stabilizzazione di p53. In seguito a danno al DNA, una serie di protein chinasi sono in grado di fosforilare e stabilizzare p53. Allo stesso modo, in caso di deprivazione di glucosio, l'attivazione di p53 dipendente dalla protein chinasi attivata da AMP (AMPK) tramite fosforilazione della serina-15 è necessaria per l'induzione da parte di p53 di un arresto transitorio del ciclo cellulare.

Il controllo della progressione del ciclo cellulare, della riparazione del DNA e dell'apoptosi sono le funzioni di p53 più studiate. Nei vertebrati, p53 ha la capacità di bloccare temporaneamente il ciclo cellulare e promuovere la riparazione del DNA. In determinate circostanze, p53 è anche in grado di indurre senescenza o promuovere l'apoptosi, fornendo così meccanismi contro l'accumulo di cellule potenzialmente maligne o difettose.

In risposta al danno al DNA, p53 induce la morte cellulare per apoptosi principalmente attraverso l'attivazione trascrizionale di geni pro-apoptotici classici, come PUMA, BAX e NOXA, insieme ad altri geni con funzioni pro-apoptotiche. Inoltre, p53 può modulare l'apoptosi attraverso la sua interazione con modulatori apoptotici nel citoplasma o nella membrana mitocondriale (Berkers et al., 2013).

Sebbene la morte cellulare dipendente da p53 prevenga l'accumulo di cellule danneggiate, p53 ha anche la capacità di ritardare la progressione del ciclo cellulare e promuovere la riparazione del DNA. L'arresto del ciclo cellulare è indotto da p53 tramite l'induzione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente p21 o la repressione della fosfatasi Cdc25c, che compromette la progressione del ciclo cellulare rispettivamente nelle transizioni G1-S e G2-M.

In risposta al danno al DNA, p53 induce un checkpoint reversibile della fase G1 insieme a geni di riparazione del DNA, consentendo alle cellule di correggere le lesioni del DNA prima di un'ulteriore divisione cellulare.

Esaminare l'espressione di p53 nell'OI può chiarire il suo ruolo nella patogenesi della malattia, potenzialmente svelando nuove strategie terapeutiche (Besio et al., 2019; Mirigian et al., 2016).

## SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è quello di analizzare tramite tecniche istochimiche e immunoistochimiche le caratteristiche cellulari e istologiche di tessuti di rene e fegato del modello sperimentale murino Brtl, che presenta la mutazione  $Col1a1^{+/G349C}$  (Garibaldi et al., 2022), comparando i dati al corrispettivo controllo sano (CTRL).

In questo modo, trattando in parallelo tessuti Brtl e CTRL con gli stessi protocolli, lo stesso numero di esemplari divisi per sesso e della stessa età (12 mesi), si possono ottenere dati solidi e affidabili avvalendosi delle differenze di segnale fra il gruppo Brtl e CTRL potendo anche fare studi di genere.

Questo studio è una base di partenza per ulteriori ricerche sull'OI, altre malattie di tipo cronico congenite e lo studio del comportamento delle cellule in questi tessuti in condizioni di stress.

Dopo un'accurata ricerca in letteratura sull'OI, malattie da accumulo, tecniche e protocolli per lo studio di malattie congenite, abbiamo scelto di proseguire con un'analisi multiorgano su modello transgenico murino con immunoistochimica.

Per lo studio delle strutture istologiche abbiamo utilizzato colorazioni in ematossina-eosina e la colorazione tricromica di Picro-Mallory. Per l'analisi di autofagia e livelli di apoptosi abbiamo scelto una immunoistochimica indiretta con rilevazione degli anticorpi p62 e LC3B. Mentre, per lo studio di risposta al danno al DNA abbiamo utilizzato gli anticorpi p53 e PARP.

Abbiamo scattato fotografie al microscopio ottico a campo chiaro dei tessuti trattati, e le foto così acquisite sono state utilizzate per quantificare il segnale di ciascun anticorpo e renderlo quindi utilizzabile per fare analisi di comparazione usando in combinazione il programma CellProfiler ed Excel, mentre le statistiche sono state fatte su Graphpad Prism v 10.2.3.

## **MATERIALI E METODI**

### **Scelta dei campioni**

Per il nostro studio sono stati utilizzati rispettivamente 2 femmine sane (Wild Type, WT) di 12 mesi, 2 maschi sani di 12 mesi, 2 femmine eterozigoti (Het) di 12 mesi e 2 maschi eterozigoti di 12 mesi.

I 4 campioni WT servono da controllo mentre i 4 campioni Het fungeranno da caso. Questo per effettuare le analisi e poter rapportare i fenotipi rilevati a un campione "0", ciò serve a individuare le differenze e a quantificarle rispetto a un campione fisiologico (non patologico).

In stabulario, per identificare quali fossero gli esemplari WT e Het, e quindi distinguerli fra di loro, viene fatto un prelievo sanguigno dalla coda (vena caudale). Il campione viene dotato di un codice identificativo, tramite il quale può essere associato all'esemplare murino di partenza. Il campione di sangue viene analizzato e genotipizzato per vedere se è presente la mutazione Col1a1+/G349C, quindi, i topi senza la mutazione rientreranno nel gruppo WT, mentre quelli che la presentano faranno parte del gruppo Het.

Una volta individuati gli esemplari adatti allo studio, e della giusta età, vengono sacrificati. La metodica utilizzata in stabulario per questo tipo di studio è di anestetizzare l'esemplare con isofluorano per inalazione. Si valuta se il topo è incosciente testando il movimento delle palpebre, se questo non vi è, si può procedere con il ghigliottinamento con lo strumento specifico (Aldrich Milwaukee, WI, USA). Si asportano fegato e reni e vengono lavati in tampone fosfato salino (PBS) 1x per eliminare sangue ed eventuali residui del trattamento che potrebbero inficiare le successive fasi di trattamento.

### **Preparazione organi: embedding**

Seguendo le Good Laboratory Practices, indossare guanti e camice durante tutti gli step del protocollo, avendo cura di non inquinare i campioni con agenti esterni e maneggiare con cautela i solventi utilizzati sotto cappa chimica.

Conservare reni e fegati di interesse in una provetta Falcon™ (50 MI) etichettata con il numero del campione/esemplare di provenienza, all'interno di esse vi deve essere oltre

agli organi, paraformaldeide fredda (4°C) al 4% in PBS 1x; la soluzione deve essere in quantità tali da sommergere abbondantemente gli organi. Lasciare le provette per 24 h in frigorifero (4°C).

Smaltire la soluzione e riempire la provetta con PBS 1X fredda (4°C) in acqua distillata e conservare il campione in frigorifero per 9 ore.

Smaltire la soluzione di PBS 1x e immergere il campione in H<sub>2</sub>O distillata fredda per 15 ore.

Smaltire l'acqua distillata e immergere il campione in una soluzione fredda di etanolo (EtOH) al 70% in acqua distillata per almeno 72 ore.

A questo punto se gli organi perdono fluidi, effettuare un ulteriore passaggio in EtOH al 70%, altrimenti procedere.

Smaltire l'EtOH al 70%, tagliare l'organo a pezzi, in modo da ottenere per il fegato 3 lobi di cui 1 mediale e 2 laterali (in alcuni tagli può essere presente la cistifellea), mentre per i reni tagliare il rene destro in senso sagittale e il rene sinistro in trasversale.

Mettere le parti dell'organo in biocassette etichettate in EtOH fredda all'80% per 24 ore, ogni biocassetta conterrà un organo.

Durante questo periodo, preparare il Paraplast X-TRA® (Sigma Aldrich, Milan, Italy) caldo (60°C) e lasciarlo sciogliere in stufa per almeno una notte. Raccogliere l'EtOH 80% usato in un contenitore opportunamente etichettato e immergere il campione in EtOH 95% freddo per 1 ora.

Raccogliere l'EtOH 95% usato in un contenitore opportunamente etichettato e immergere il campione in acetone per 2 ore a temperatura ambiente, cambiando l'acetone ogni ora. Raccogliere l'acetone usato in un contenitore opportunamente etichettato.

Immergere il campione in paraplast e lasciarlo in incubazione per almeno 2 ore e mezza (il tempo di penetrazione dipende dal tessuto che si sta processando) a 60°C in modo da mantenere il paraplast in forma liquida e permettere la permeazione degli organi da parte di questo.

Preparare stampi ed etichette per ogni blocco e un dispenser di paraplast liquido (60°C) per includere i campioni.

Mettere un po' di paraplast sullo stampo caldo e posizionare l'organo orientato nello stampo, mantenendolo in posizione fino a quando il paraplast non si è solidificato. È importante che la superficie di taglio sia rivolta verso il fondo dello stampo e che i pezzi

siano allineati sullo stesso piano, ciò per avere nelle fasi successive una panoramica ottimale dei campioni istologici quando si andrà a tagliare al microtomo.

Riempire lo stampo con paraplast e posizionare l'anello sopra con un'etichetta di carta (riportante: numero del campione e organo), quindi riempire ulteriormente l'anello.

Durante tutte le fasi di inclusione è importante procedere il più rapidamente e precisamente possibile, in modo da evitare la formazione di bolle e ottenere un campione istologico ottimale.

Lasciare gli stampi a temperatura ambiente per permettere una solidificazione graduale, ciò per evitare eventuali rotture a causa dello stress di temperatura.

Quando completamente solidificati, rimuovere i blocchetti dagli stampi e procedere con il taglio al microtomo.

Per il nostro studio abbiamo utilizzato il modello microtomo a rotazione, semiautomatico, Leica RN 2155 (Leica Biosystems, Buccinasco, MI, Italia), ottenendo sezioni dello spessore di 8  $\mu\text{m}$ , spessore ottimale per analisi a microscopio ottico. Oltre al microtomo per questo passaggio sono stati utilizzati pennelli, pinzette, bisturi, lamette, un bagnetto termostato, un microscopio ottico a campo chiaro e vetrini Slide polysine (Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, USA). I vetrini polysine sono trattati in modo da avere la superficie carica positivamente e permettere un attacco più adesivo da parte della sezione al vetrino stesso.

Prima di procedere con il taglio effettivo al microtomo si effettua il "trimming" (o sgrossatura), in cui si sagoma il campione in modo da ottenere una piramide tronca a base trapezoidale per rimuovere la paraffina intorno al campione fino all'affioramento dello stesso.

Quando si ha una sezione, la si adagia tramite gli strumenti sopra citati sulla superficie del bagnetto (35-40°C). Questa fase serve per riscaldare lievemente il paraplast e permetterne il rilassamento sulla superficie dell'acqua calda, ciò consente di ottenere sezioni ben distese senza pieghe. Quindi, posizionare il vetrino e farvi aderire due sezioni. Durante queste fasi è importante visualizzare i vetrini fatti al microscopio ottico per vedere se il campione sia stato ben incluso e conservato.

Una volta ottenute circa 20-30 vetrini per organo, mettere i vetrini fatti in stufa (37°C) per una notte, questo per migliorare l'adesione delle sezioni al vetrino e permettere una completa asciugatura.

## **Idratazione dei campioni**

Poiché le reazioni di colorazione sia morfologica sia immunoistochimiche utilizzate per il nostro studio necessitano di un ambiente idrofilico, si procede innanzitutto con una scala graduale di solventi per estrarre la paraffina (paraplast) dal campione e arrivare a una soluzione acquosa (acqua distillata). Questo procedimento deve essere graduale e controllato sia nei tempi sia nelle concentrazioni per evitare di causare stress osmotico alle cellule sul vetrino. Questi passaggi devono essere svolti sotto cappa chimica di tipo C per questioni di sicurezza (lo xilene è neurotossico).

La reidratazione del campione prevede il passaggio dei vetrini in jar citologiche con xilene per 10 minuti, EtOH assoluto e xilene per 5 minuti, EtOH assoluto per 5 minuti, EtOH al 95% per 3 minuti e EtOH al 70% per 3 minuti.

Terminata la scala si può procedere con i trattamenti di colorazione o di immunoistochimica.

## **Colorazione morfologica istochimica: ematossilina/eosina**

Al microscopio ottico, l'effetto di risalto e quindi di contrasto delle componenti della sezione, è dato da una caratteristica colorazione delle strutture che rivelano affinità al colorante utilizzato.

La colorazione tramite ematossilina/eosina è la colorazione morfologica di base più utilizzata in microscopia ottica per lo studio di citologia e istologia. È una colorazione bicromica che si basa sul diverso valore di pH dei vari tessuti e degli organelli cellulari; il nucleo e le componenti acide del citoplasma (ribosomi) vengono colorati in blu-viola dall'ematossilina, che è un colorante basico, mentre il citoplasma e la matrice extracellulare dei tessuti connettivi vengono colorati in rosa arancio dalla eosina che è un colorante acido.

## **Colorazione morfologica istochimica: tricromica di Picro Mallory**

La colorazione tricromica di Mallory è particolarmente indicata per sezioni di tessuto connettivo, molto usata in diagnostica medica. Per materiali e protocolli ci siamo attenuti alle linee guida fornite dal datasheet del kit Picro Mallory tricromica (Bio-Optica Milano S.p.A.).

L'elettività del metodo nell'evidenziare le varie componenti connettivali endocellulari ed esocellulari, si basa sul diverso grado di affinità chimica dei coloranti utilizzati per le macromolecole tessutali. In particolare, presentando il connettivo una spiccata acidofilia, dovuta alla presenza di numerosi gruppi basici, è prevedibile una forte affinità per coloranti acidi (acido picrico e arancio G) e una media affinità per coloranti anfoteri debolmente basici (fucsina acida e xilidina ponceau). Un ruolo fondamentale è svolto dall'acido fosfomolibdico che agisce da ponte fra le strutture tissutali a cui selettivamente si lega (fibrille del collagene, membrane cellulari ecc.) e il blu di anilina, colorante anfotero con carattere più spiccatamente basico.

Quindi complessivamente il protocollo prevede l'utilizzo di 6 coloranti diversi che permettono quindi grazie alle loro affinità con le componenti del tessuto, di avere 6 colorazioni diverse (in totale: Ematossilina Ferrica secondo Weigert A, Ematossilina Ferrica secondo Weigert B, Ponceau B soluzione, Fucsina acida – Ponceau xilidina soluzione, Acido fosfomolibdico soluzione, Blu di anilina soluzione).

Abbiamo scelto questo metodo come ulteriore interfaccia per la comprensione morfologia delle strutture istologiche e della loro disposizione negli organi in studio. Per valutare le informazioni di tipo qualitativo, abbiamo considerato in parallelo i dati estrapolati dalle analisi effettuate con ematossilina eosina. In riassunto, grazie a questo tipo di colorazione morfologica si comprende la composizione delle strutture in base alla colorazione (solo informazioni qualitative). Qui sotto una tabella per l'identificazione.

<b>Nuclei</b>	Bruno scuro
<b>Fibre di collagene</b>	Blu scuro
<b>Sostanza fondamentale di cartilagine e osso, muco, granuli basofili dell'ipofisi e amiloide</b>	Blu in varie tonalità

<b>Fibrina</b>	Rosso
<b>Eritrociti</b>	Rosa pallido – giallo
<b>Fibre elastiche</b>	Rosa pallido – giallo o incolori

*Tabella 2 Colorazioni che assumono le componenti cellulari del campione istologico (Data Sheet del kit utilizzato, Bio-Optica Milano S.p.A.).*

## **Reazione immunocitochimica: principi base e protocollo**

### **Principi base**

La tecnica dell'immunocitochimica è utilizzata nella ricerca di base, in diagnostica medica ed in terapia.

Le reazioni di immunocitochimica sfruttano il legame specifico di un anticorpo al suo antigene e la colorazione chimica data da un sistema rivelatore, nel nostro caso, il sistema ABC (Avidina Biotina Complex) con attaccato l'enzima perossidasi e la 3,3'-Diaminobenzidina (DAB).

Le reazioni usate per questo studio sono reazioni che sfruttano due anticorpi (reazione indiretta). Il primo, detto anticorpo primario, riconosce l'antigene presente sul campione (se è presente), mentre il secondo, l'anticorpo secondario, riconosce il segmento Fc (regioni costanti carbossi-terminali delle catene pesanti degli anticorpi) dell'anticorpo primario e ha legato a sé una parte del complesso ABC (Biotina). La marcatura indiretta è un metodo più complesso rispetto alla marcatura diretta (con un anticorpo) però possiede diversi vantaggi: l'anticorpo primario, in genere assai prezioso, non si lega al marcatore e così pochi anticorpi secondari possono essere utilizzati per rivelare innumerevoli anticorpi primari. Gli anticorpi secondari impiegati sono sempre policlonali diretti contro la regione Fc dell'anticorpo primario di cui riconoscono più epitopi, amplificando così di molto il segnale di reazione

L'anticorpo secondario da impiegare è diretto contro la specie ospite usata per generare l'anticorpo primario; nel nostro caso, se si utilizza un anticorpo primario prodotto in topo, servirà un anticorpo secondario anti-topo prodotto in una specie ospite diversa dal topo come il coniglio; e viceversa se l'anticorpo primario viene prodotto in coniglio.

Questo tipo di tecnica dà sia un'informazione qualitativa dell'antigene (presenza/assenza, localizzazione), sia un'informazione quantitativa riguardo il livello di espressione dell'antigene relativo alla sua concentrazione in un campione.

Il complesso ABC (*Avidin Biotin Complex*) serve per aumentare il segnale di rilevazione, questo sfrutta l'elevata affinità che l'avidina, glicoproteina dell'albume dell'uovo, ha nei confronti della biotina. Si crea un complesso avidina – biotina- perossidasi il quale può legarsi per affinità a molecole di biotina, che ricordiamo, sono coniugate ad un anticorpo secondario diretto contro l'anticorpo primario che reagisce con l'antigene.

Attaccato all'avidina, vi è l'enzima perossidasi, che catalizza l'ossidazione di molti substrati mediante trasferimento di H<sup>+</sup> ed elettroni al perossido di idrogeno che viene ridotto ad H<sub>2</sub>O. In questo caso è stata utilizzata la DAB come substrato donatore di H<sup>+</sup> ed elettroni; la DAB ossidandosi forma un prodotto marrone insolubile che precipita nella sede in cui si trova l'enzima.

### **Protocollo interno di immunoistochimica**

Dopo la scala di idratazione si procede con lo smascheramento antigenico tramite trattamento fisico col calore in un bagnomaria: i vetrini sono immersi in una soluzione di tampone sodio citrato a valore di pH tale da smascherare l'antigene target (pH 6) e riscaldate (95°C per 20 min).

Si fa raffreddare la jar a temperatura ambiente per 20 min.

Da questo momento i vetrini sono posti in una camera umida per tutte le fasi successive della reazione, per evitare che le sezioni si asciughino durante le reazioni, determinando possibili colorazioni di fondo aspecifiche o artefatti di varia natura o degradazione del tessuto per essiccamento.

Si lavano le sezioni con acqua distillata e PBS 1x freddo (4°C).

Utilizzare la Pap Pen per cerchiare ogni sezione presente sul vetrino e quindi per poter dividere le reazioni. La Pap Pen rilascia una soluzione idrofobica che permette di separare in cupolette sezioni diverse ma vicine fra loro.

Dato che nel nostro protocollo viene utilizzato come sistema di rilevazione la perossidasi, si devono neutralizzare gli stessi enzimi presenti nelle cellule del campione (enzimi endogeni) per evitare reazioni positive aspecifiche. Perciò si bloccano le perossidasi endogene con perossido di idrogeno 3% per 10 min, poi risciacquare con PBS 1x.

Incubare i vetrini in PBS 1x per 5 min.

Per evitare che gli anticorpi usati nella reazione si leghino in maniera aspecifica a componenti molecolari è necessario saturare o siti di legame aspecifici presenti nel campione, diverse dall'antigene ricercato attraverso interazioni elettrostatiche o idrofobiche. Il blocco dei siti di legame aspecifici viene fatto impiegando proteine inerti che vengono applicate sulle sezioni prima dell'anticorpo, siero non immune (coniglio o topo); abbiamo utilizzato il siero della stessa specie animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario e non correlato con l'anticorpo primario del kit VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Vector Laboratories, Inc., USA) diluito 1:10 in PBS 1x per 20 min.

Incubare il campione con l'Ab primario del kit diluito O.N. a temperatura ambiente con ghiaccio per mantenere una temperatura intorno ai 4°C, perché così si riduce al minimo l'eventuale rumore di fondo (o background) dovuto a legami aspecifici rispetto a un'incubazione più breve a R.T. (temperatura ambiente).

Anticorpi primari utilizzati:

Nome anticorpo	Diluizione in PBS 1x	Animale di provenienza	Azienda produttrice	Nome commerciale
<b>P53</b>	1:300	Topo	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-126
<b>P62</b>	1:500	Topo	Genetex, Inc.	GTX 629888
<b>PARP1</b>	1:200	Coniglio	Cell Signal, Inc.	9532S
<b>LC3B</b>	1:100	Coniglio	Cell Signal, Inc.	CS 27755

*Tabella 3 Anticorpi primari (nome, diluizione, animale in cui viene prodotto, azienda, nome commerciale)*

Risciacquare i vetrini con PBS 1x e lasciarli in PBS 1X + Tween 20 per 5 minuti. Incubare i vetrini con l'Ab secondario del kit VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit (Vector Laboratories, Inc., USA) diluito 1:200 in PBS 1X per 30 minuti (ogni sezione può contenere fino a 30 µL e l'Ab secondario deve essere contro la specie dell'Ab primario). Risciacquare i vetrini con PBS1X e lasciarli in PBS1X a 20°C per 5 minuti.

Incubare i vetrini con la miscela ABC (20  $\mu$ L di reagente A e 20  $\mu$ L di reagente B in 1000  $\mu$ L di PBS 1X) per 30 minuti.

Risciacquare i vetrini con PBS e lasciarli in PBS per 5 minuti.

Preparare la miscela del reagente DAB aggiungendo 1 goccia di reagente DAB in 1 mL di diluente DAB e mescolare bene del kit ImmPACT® DAB Substrate Kit, Peroxidase (Vector Laboratories, Inc., USA) (la DAB è potenzialmente cancerogeno. Maneggiare con cura la miscela e i supporti e tutto ciò che entra in contatto con il DAB deve essere inattivato con H<sub>2</sub>O e candeggina) sotto cappa di aspirazione.

Incubare i vetrini utilizzando il tempo di rivelazione della DAB (precedentemente testato) come tempo di incubazione e risciacquare i vetrini con acqua distillata per bloccare la reazione.

Controcolorare i vetrini con ematossilina di Carazzi per 30 secondi e risciacquare i vetrini in H<sub>2</sub>O di rubinetto per 5 minuti e poi in H<sub>2</sub>O distillata.

### **Diluizioni e tempo di incubazione della DAB**

Essendo gli anticorpi primari molto diversi fra loro, è importante calcolare le diluizioni da effettuare tenendo conto delle diverse indicazioni delle case produttrici. Inoltre, essendo variabile l'intensità di precipitazione della DAB nei diversi tipi di tessuto e con i diversi tipi di anticorpo utilizzato è altrettanto necessario effettuare i calcoli di tempo di incubazione separatamente.

Per verificare il tempo di rivelazione, si prende una sezione di prova e si inizia con la normale reazione di precipitazione della DAB (100  $\mu$ L), lo si fa controllando l'intensità di colore a un microscopio ottico. Quando l'intensità sarà sufficiente per individuare le zone di precipitazione, si interrompe la reazione immergendo il vetrino in acqua distillata (si deve bloccare la reazione quando si inizia a vedere una colorazione parziale del fondo). Il tempo necessario per ottenere una sezione ben calcolabile, sarà lo stesso che verrà impiegato per tutte le altre sezioni con quell'anticorpo primario e con quello stesso organo. Qui una tabella riassuntiva delle diluizioni e dei tempi di DAB utilizzati.

<b>Anticorpo utilizzato</b>	<b>Diluizione in PBS</b>	<b>Organo</b>	<b>Tempo di incubazione DAB</b>
---------------------------------	--------------------------	---------------	---

<b>PARP</b>	1:200	Fegato	6 min 20 s
		Reni	2 min 30s
<b>P53</b>	1:300	Fegato	2 min 40 s
		Reni	3 min 10 s
<b>P62</b>	1:500	Fegato	3 min
		Reni	2 min
<b>LC3B</b>	1:100	Fegato	2 min
		Reni	3 min 15 s

*Tabella 4 Anticorpi secondari (nome, diluizione, tempi di DAB specifici per l'organo in esame).*

### **Disidratazione e montaggio dei vetrini**

Al termine della colorazione, per preservare il tessuto, si torna a un ambiente idrofobico tramite scala di disidratazione, il protocollo è lo stesso dell'idratazione ma all'inverso.

La disidratazione del campione prevede il passaggio dei vetrini in jar citologiche in EtOH al 70% per 3 minuti, EtOH al 95% per 3 minuti, EtOH assoluto per 5 minuti, EtOH assoluto e xylene per 5 minuti e xylene per 10 minuti.

Infine, si procede col montaggio del vetrino con resina Eukitt® (Kindler GmbH) che serve per fissare in maniera permanente il vetrino coprioggetto al vetrino e proteggere ulteriormente le sezioni. Si lascia polimerizzare la resina sotto cappa O.N..

### **Cattura**

Quando il vetrino è pronto per essere analizzato, si procede con l'acquisizione di immagini al microscopio ottico OLYMPUS BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) dotato di sistema fotografico OLYMPUS EP50 (Firmware Version V4.0\_28230523) a sua volta collegato un computer per poter controllare le immagini ottenute ed eventualmente modificare le impostazioni di cattura (luce, saturazione, intensità luminosa, contrasto).

Per ogni porzione sono stati catturati 5 campi a ingrandimento 4x, all'interno di ogni campo 4x sono stati catturate 5 immagini a ingrandimento 10x. In ogni sezione di fegato

e rene sono presenti 4 porzioni; quindi, sono state acquisiti in totale per ogni sezione 20 campi a ingrandimento 4x e almeno 100 immagini a 10x.

Per le analisi grafiche sono stati utilizzati 20 campi 10x per ogni esemplare.

### **Analisi foto e statistiche**

I valori sono stati acquisiti grazie a Cellprofiler, elaborati su Excel e i risultati sono stati analizzati tramite Graphpad Prism 10.2.3 ed espressi come media  $\pm$  SEM (*Standard Error of the Mean* o  $\sigma$ ).

## RISULTATI

### Conta cellulare

Per il nostro studio abbiamo svolto analisi chimiche ed immunoistochimiche volte a studiare il controllo sano (CTRL, senza la mutazione) e il modello sperimentale di OI (*Brtl*, con la mutazione), per calcolare in maniera statistica le differenze fra caso e controllo, divisi ulteriormente per sesso.

Innanzitutto, abbiamo calcolato la popolazione cellulare media di ciascun organo in maniera separata, utilizzando i vetrini colorati con Ematossilina-Eosina.

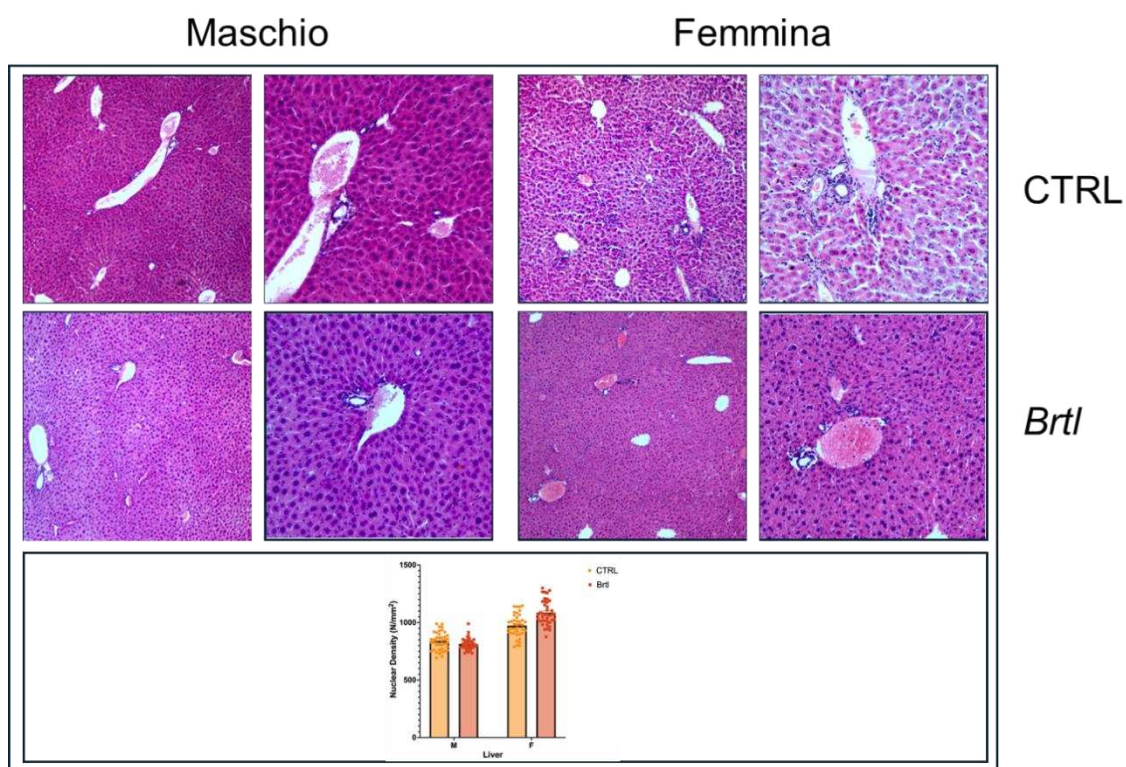


Figura 23 Ematossilina-Eosina e istogrammi per la densità nucleare nel fegato. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Gli istogrammi esprimono i valori in cellule / mm<sup>2</sup>

Nei topi di 12 mesi, l'organizzazione tissutale epatica è stata preservata in tutti i gruppi studiati, con un'architettura intatta dei vasi sanguigni e dei canali biliari. La polarità tissutale complessiva e la disposizione del parenchima e dello stroma sono state mantenute.

Dopo la processazione, è stata osservata una lieve lassità vascolare, evidente come rilassamento post-trattamento delle pareti vasali e del calibro sinusoidale. La densità cellulare quantitativa, derivata dalle conte nucleari delle analisi effettuate tramite

CellProfiler, ha mostrato una modesta diminuzione relativa nei maschi *Brtl* (-25 nuclei/mm<sup>2</sup> rispetto ai controlli) e un aumento nelle femmine *Brtl* (+112 cellule/mm<sup>2</sup>). Interpretando questi cambiamenti, la riduzione maschile è coerente con una lieve rarefazione parenchimale e/o una dilatazione sinusoidale post-processamento che riduce i nuclei per unità di area, mentre l'aumento femminile suggerisce una relativa compattazione parenchimale o una maggiore rilevabilità nucleare alle stesse condizioni di trattamento. Nel complesso, la citoarchitettura rimane ampiamente conservata, con lievi aggiustamenti sesso-dipendenti nell'impacchettamento microanatomico che probabilmente riflettono una differente compliance vascolare e una diversa sensibilità al processamento piuttosto che una grave alterazione strutturale.

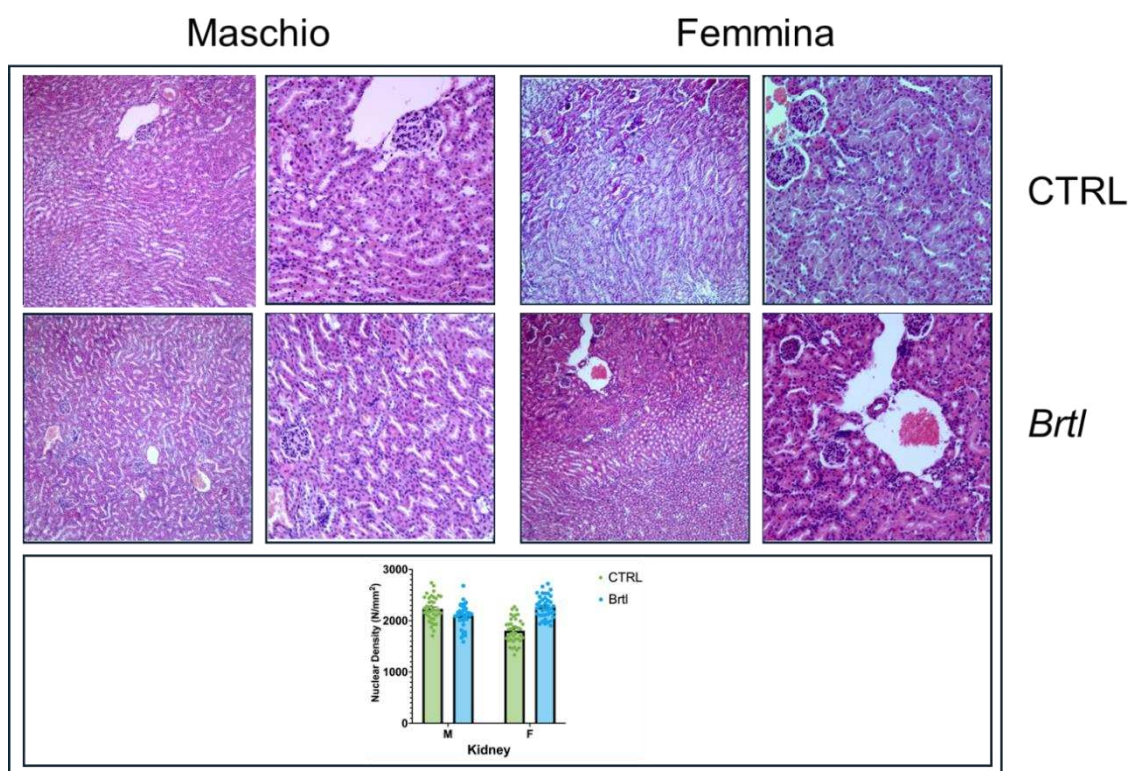


Figura 24 Ematossilina-Eosina e istogrammi per la densità nucleare nel rene. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Gli istogrammi esprimono i valori in cellule / mm<sup>2</sup>

Nei topi di 12 mesi, l'organizzazione tissutale renale complessiva è stata preservata in tutti i gruppi, con glomeruli intatti (capsula di Bowman, anse e vasi) e segmenti tubulari ben definiti all'interno parenchima. La polarità tissutale complessiva e la disposizione

funzionale di parenchima e stroma sono state mantenute. Dopo la processazione, i vasi apparivano leggermente lassi e le loro pareti leggermente assottigliate, con occasionali allargamenti dei lumi capillari. La densità nucleare quantitativa ha indicato una relativa diminuzione nei maschi *Brtl* di ~133 nuclei/mm<sup>2</sup> rispetto ai controlli e un aumento nelle femmine *Brtl* di ~460 nuclei/mm<sup>2</sup>. Una volta interpretata, la riduzione nel maschio è compatibile con una lieve rarefazione parenchimale e/o dilatazione luminale/vascolare post-processamento che riduce i nuclei per unità di area, mentre l'aumento nel femmina suggerisce una relativa compattazione parenchimale o una maggiore rilevabilità nucleare nelle stesse condizioni.

Nel complesso, la citoarchitettura renale rimane ampiamente conservata, con aggiustamenti microanatomici sesso-dipendenti che probabilmente riflettono differenze nella compliance vascolare e nella sensibilità al processamento piuttosto che una grave alterazione strutturale.

Per la densità nucleare è stato utilizzato il Test Anova 2-ends (con p-value < 0,0001).

Riassumendo in una tabella tutti i risultati delle conte in una tabella:

<b>Densità nucleare nel fegato</b>	
<b>Media nei maschi controllo</b>	839,27 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Media nei maschi Brtl</b>	813,27 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Media nelle femmine controllo</b>	973,27 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Media nelle femmine Brtl</b>	1086,02 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Densità nucleare nei reni</b>	
<b>Media nei maschi controllo</b>	2232,33 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Media nei maschi Brtl</b>	2098,69 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Media nelle femmine controllo</b>	1805,24 cellule / mm <sup>2</sup>
<b>Media nelle femmine Brtl</b>	2268,24 cellule / mm <sup>2</sup>

*Tabella 5 Tabella riassuntiva dei risultati delle conte cellulari espresse in cellule / mm<sup>2</sup>.*

Mentre per le immunostochimiche abbiamo calcolato l'intensità di segnale della DAB intracellulare dei campi catturati per ciascun caso (quindi divisi per genotipo e per sesso). Successivamente i valori sono stati normalizzati alla media del corrispettivo controllo (Media del controllo x valore %). Il segnale rilevato non è stato diviso fra l'intranucleare e citoplasmatico

I risultati sono stati analizzati per verificare differenze statisticamente significative, per l'intensità del segnale nelle immunostochimiche il test t-student (con p-value < 0,001).

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*). Tutti gli studi immunostochimici caso controllo sono risultati statisticamente significativi.

## Autofagia e apoptosi nel fegato

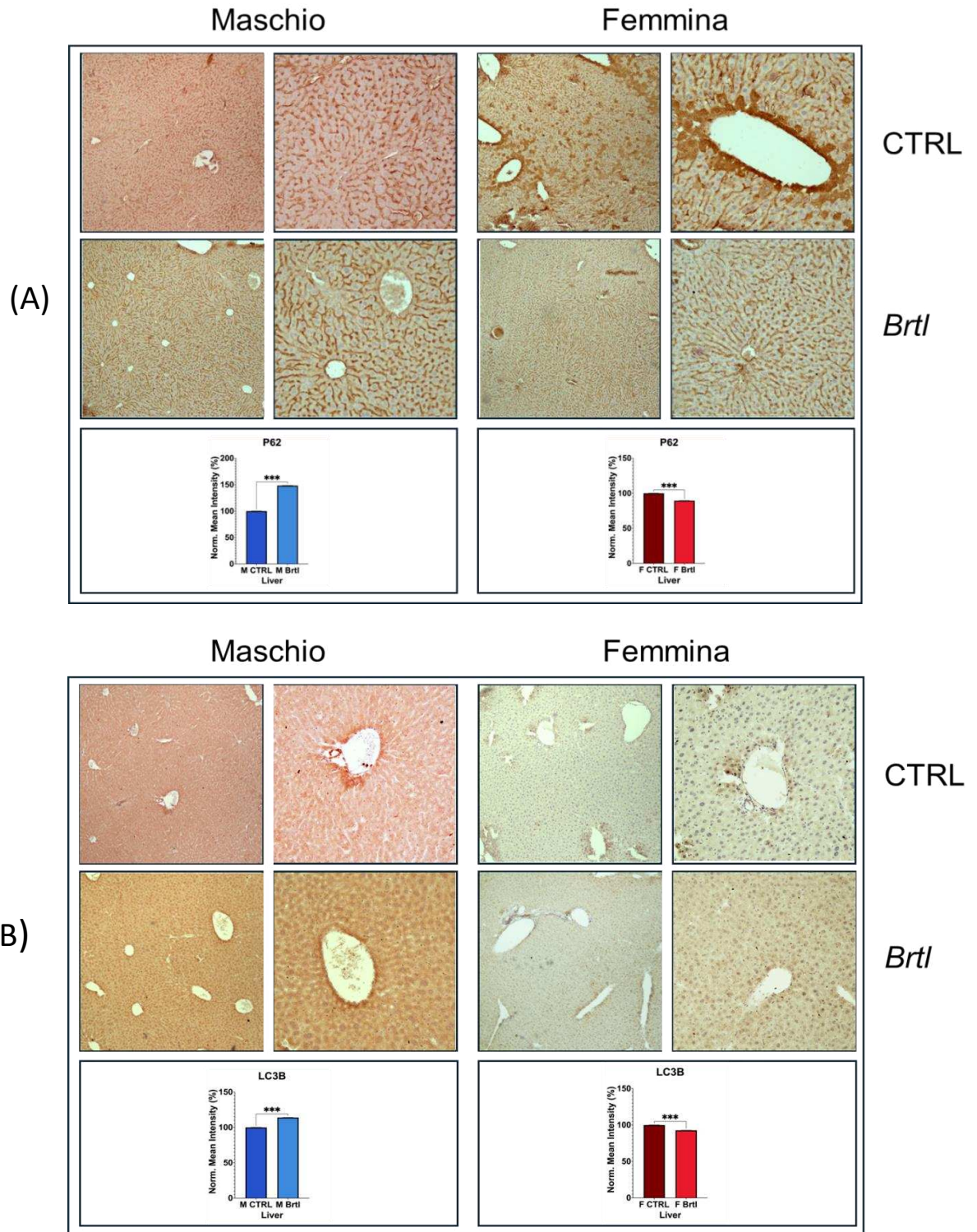


Figura 25 (A) Immunoistochimica e istogrammi per P62 nel fegato. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore  $p$ : \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Immunoistochimica e istogrammi per LC3B nel fegato. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore  $p$ : \*\*\*  $p < 0.001$ .

L'autofagia e l'apoptosi epatica sono state valutate quantificando p62 e LC3B su campi parenchimali completi utilizzando un flusso di lavoro CellProfiler standardizzato.

I valori sono riportati come intensità media normalizzata al controllo ed espressi come variazione percentuale ( $\Delta\% \pm \sigma$ ) ( $\sigma$  = deviazione standard).

Nei maschi *Brtl*, p62 è aumentato del  $48,45 \pm 0,5328\%$  e LC3B del  $14,07 \pm 0,2084\%$ ; nelle femmine *Brtl*, p62 è diminuito del  $10,59 \pm 0,3401\%$  e LC3B del  $7,281 \pm 0,1717\%$ .

Poiché p62 funge da recettore selettivo del carico che si accumula quando il flusso autofagico è ridotto e diminuisce quando il carico viene eliminato efficientemente, il pattern maschile (p62 aumentato con LC3B aumentato) è più coerente con un aumento dell'inizio dell'autofagosoma accompagnato da un collo di bottiglia nella fase degradativa (limitato turnover lisosomiale e/o sovraccarico di carico).

Al contrario, il pattern femminile (p62 ridotto con LC3B ridotto) suggerisce una ridotta biogenesi dell'autofagosoma insieme a un carico allo stato stazionario inferiore, compatibile sia con una ridotta richiesta autofagica basale che con un flusso relativamente preservato; distinguere questi scenari richiederebbe analisi del flusso.

Perciò, i dati indicano una regolazione sesso-specifica dell'autofagia epatica nei topi *Brtl*, con i maschi che mostrano un aumento dell'inizio ma che resta limitato, e le femmine che mostrano un valore di autofagia ridotto, senza evidenza di accumulo di carico.

Danno al DNA nel fegato

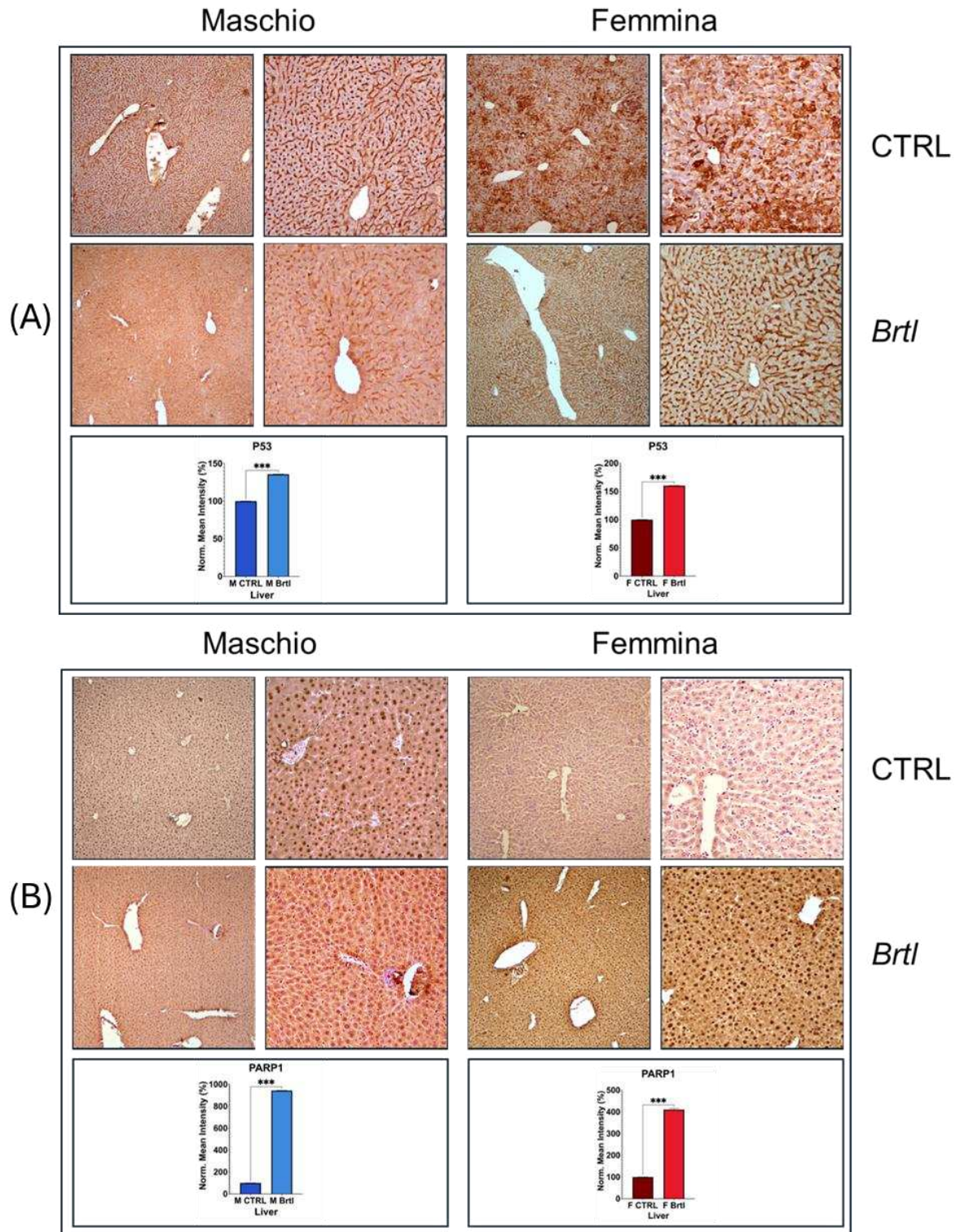


Figura 26 (A) Immunoistochimica e istogrammi per P53 nel fegato. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore p: \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Immunoistochimica e istogrammi per PARP1 nel fegato. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore p: \*\*\*  $p < 0.001$ .

La risposta al danno del DNA epatico è stata quantificata su campi parenchimali completi utilizzando un flusso di lavoro basato su CellProfiler che prende di mira p53 e PARP1. I valori sono riportati come intensità media normalizzata al controllo ed espressi come variazione percentuale ( $\Delta\% \pm \text{SEM}$ ). Nei maschi Brtl, p53 è aumentato del  $35,75 \pm 0,3028\%$  e PARP1 dell' $843,9 \pm 1,331\%$ ; nelle femmine Brtl, p53 è aumentato del  $60,40 \pm 0,2555\%$  e PARP1 del  $310,8 \pm 2,491\%$ . Funzionalmente, p53 riflette l'attivazione dei checkpoint e il controllo trascrizionale della riparazione e dell'apoptosi, mentre PARP1 marca il reclutamento mediato dal poli(ADP-ribosio) dei fattori di escissione delle basi e di riparazione delle rotture a singolo filamento. Il pattern indica una DDR sesso-specifica: i maschi mostrano una marcata sovraregolazione di PARP1 con un moderato aumento di p53, coerente con una forte dipendenza dalla riparazione guidata dalla PARilazione; le femmine mostrano una risposta più forte a p53 con un aumento di PARP1 relativamente minore, suggerendo un maggiore coinvolgimento dei checkpoint e una riprogrammazione trascrizionale. Nel complesso, questi dati supportano una robusta attivazione della DDR nel fegato Brtl, con un'enfasi divergente sulla riparazione incentrata su PARP1 nei maschi rispetto alla segnalazione dominante su p53 nelle femmine.

## Autofagia e apoptosi nel rene

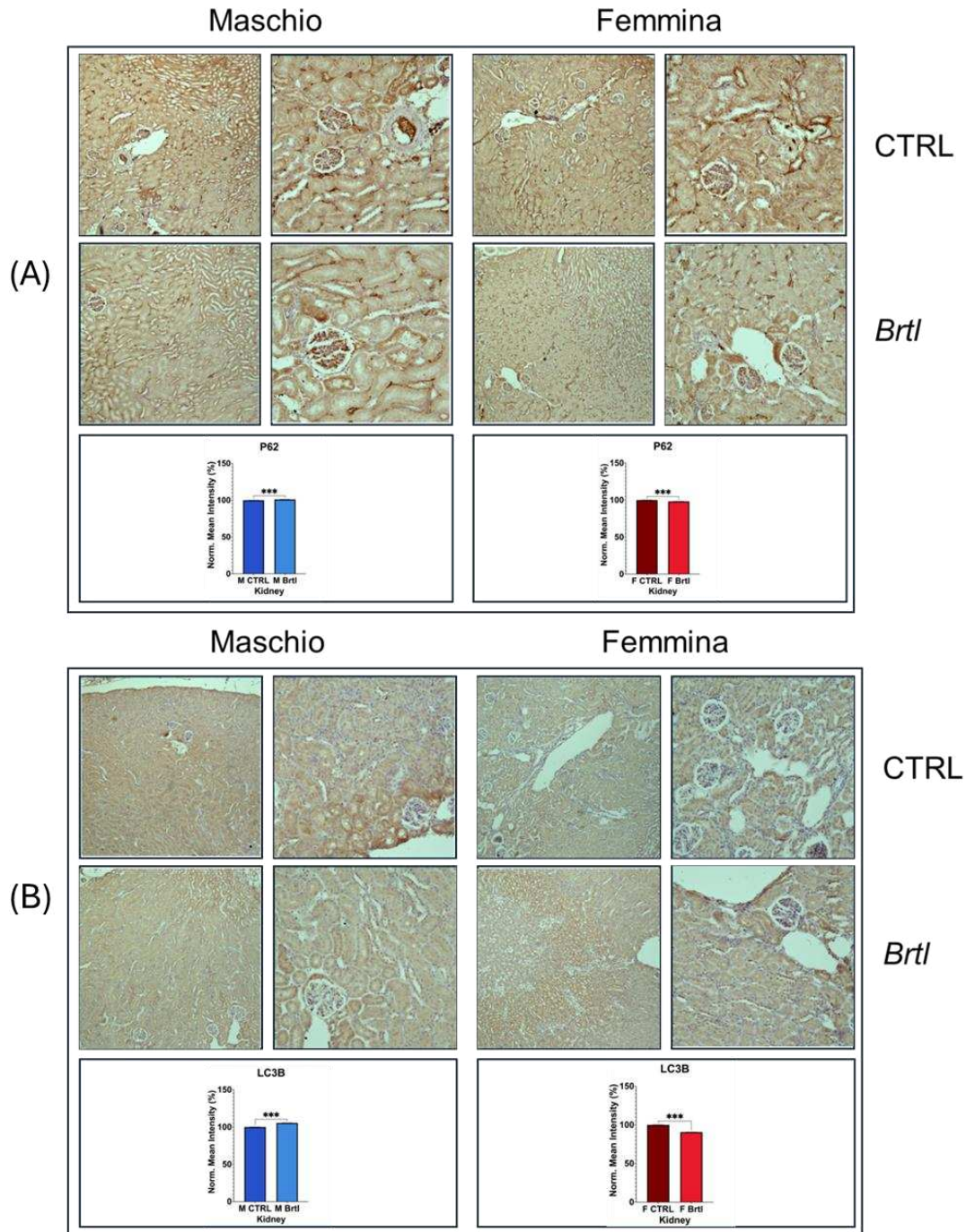


Figura 27 (A) Immunoistochimica e istogrammi per P62 nel rene. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore  $p$ : \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Immunoistochimica e istogrammi per LC3B nel rene. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore  $p$ : \*\*\*  $p < 0.001$ .

L'autofagia renale è stata valutata quantificando con p62 e LC3B su campi parenchimali renali completi utilizzando un flusso di lavoro CellProfiler personalizzato. I valori sono

riportati come intensità media normalizzata al controllo ed espressi come variazione percentuale ( $\Delta\% \pm \sigma$ ). Nei maschi *Brtl*, p62 è aumentato del  $1.128 \pm 0,1571\%$  e LC3B del  $5.452 \pm 0,1072\%$ ; nelle femmine *Brtl*, p62 è diminuito del  $1.821 \pm 0,1818\%$  e LC3B del  $9.410 \pm 0,1024\%$ . Interpretando queste letture, p62 funziona come un recettore selettivo del carico che si accumula quando il flusso autofagico è limitato, mentre LC3B è associato alla biogenesi dell'autofagosoma. Il pattern maschile (lieve innalzamento di p62 con aumento di LC3B) è coerente con un lieve aumento della formazione di autofagosomi accompagnato da un piccolo aumento del carico di trasporto, indicativo di un aumento dell'inizio con una pressione limitata sulla clearance a valle.

Il profilo femminile (diminuzione di p62 con diminuzione di LC3B) indica una ridotta biogenesi dell'autofagosoma insieme a un carico allo stato stazionario inferiore, compatibile con un valore basale dell'autofagia ridotto o un flusso relativamente preservato in condizioni di minore richiesta. Nel complesso, questi dati supportano una regolazione sesso-specifica dell'autofagia renale nei topi *Brtl*, con un modesto bias di inizio nei maschi e un tono autofagico contenuto nelle femmine.

Danno al DNA nel rene

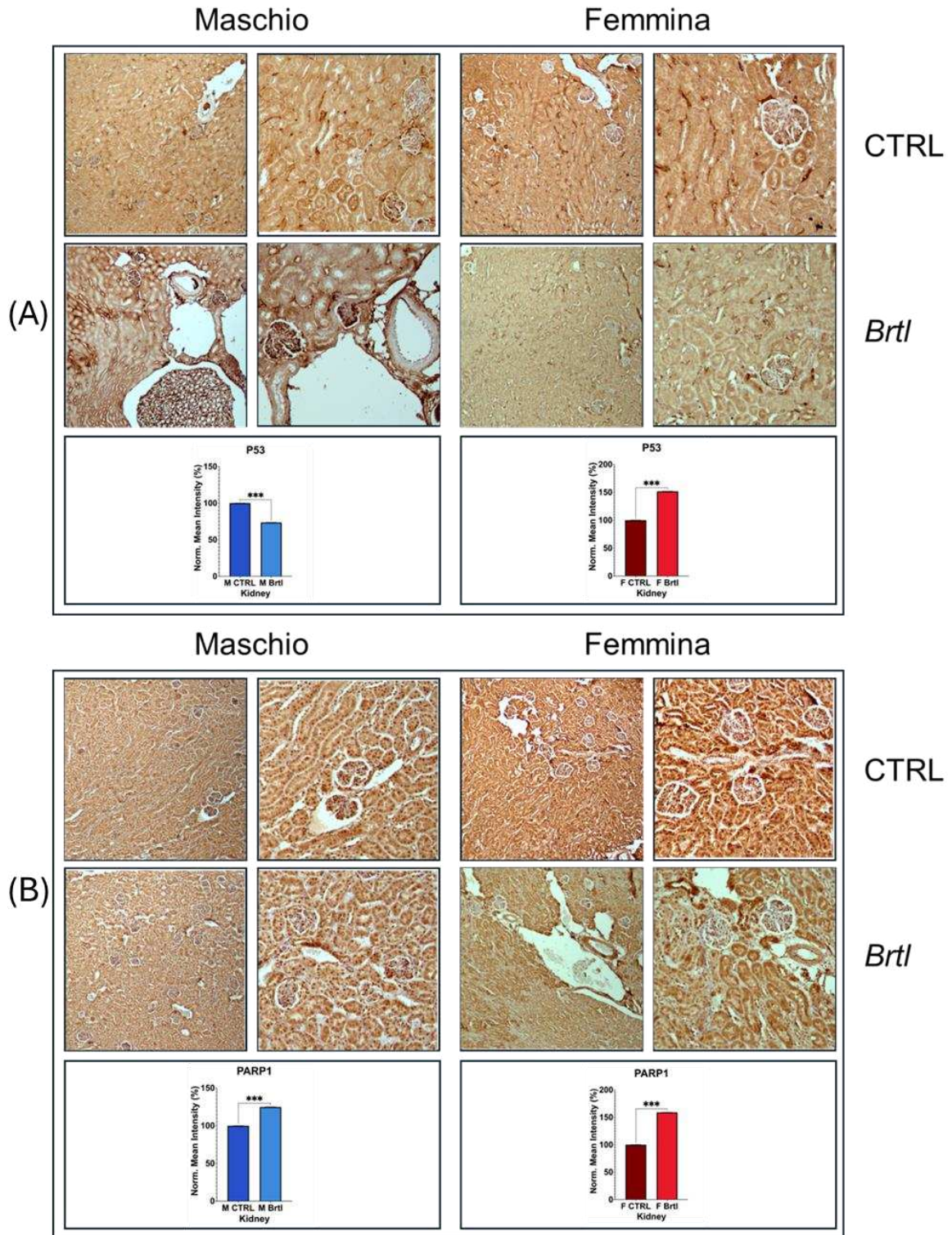


Figura 28 (A) Immunoistochimica e istogrammi per P53 nel rene. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore p: \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Immunoistochimica e istogrammi per PARP1 nel rene. A sinistra ingrandimento (10x), a destra ingrandimento maggiore (40x). Valore p: \*\*\*  $p < 0.001$ .

La risposta al danno al DNA renale è stata quantificata su campi parenchimali completi utilizzando un flusso di lavoro basato su CellProfiler volto a indagare p53 e PARP1. I valori sono riportati come intensità media normalizzata al controllo ed espressi come variazione percentuale ( $\Delta\% \pm \sigma$ ). Nei maschi *Brtl*, p53 è diminuito del  $26,38 \pm 0,2431\%$  mentre PARP1 è aumentato del  $24,83 \pm 0,3518\%$ . Nelle femmine *Brtl*, p53 è aumentato del  $51,75 \pm 0,4673\%$  e PARP1 del  $59,01 \pm 0,4065\%$ . Meccanicisticamente, p53 riflette l'attivazione dei checkpoint e il controllo trascrizionale della riparazione e delle decisioni sul destino cellulare, mentre PARP1 indica il reclutamento guidato dei fattori di escissione delle basi e di riparazione delle rotture a singolo filamento.

Il pattern maschile, con p53 attenuato e PARP1 elevato, suggerisce l'affidamento alla riparazione incentrata su PARP1 con ridotto coinvolgimento dei checkpoint.

Al contrario, le femmine mostrano un aumento del segnale concomitante di p53 e PARP1, coerente con una robusta segnalazione dei checkpoint associata a un'aumentata attività riparativa. Nel complesso, questi dati supportano una forte attivazione della risposta al danno al DNA nel rene *Brtl* con un pattern differente fra i due sessi: una risposta orientata a PARP1 e attenuata da p53 nei maschi, e a un programma aumentato da p53 e co-attivato da PARP1 nelle femmine.

In sintesi, i risultati delle immunistochemiche sono espressi nella sottostante tabella, espressi come la differenza in percentuale della media del segnale del caso (*Brtl*) dalla media del rispettivo controllo (CTRL) (divisi per anticorpo rilevato e sesso):

<b>LC3B nel fegato</b>	
<b>Maschi</b>	+ 14,07%
<b>Femmine</b>	- 7,28%
<b>P62 nel fegato</b>	
<b>Maschi</b>	+ 48,45%
<b>Femmine</b>	- 10,59%
<b>P53 nel fegato</b>	
<b>Maschi</b>	+ 35,75%

<b>Femmine</b>	+ 60,40%
<b>PARP nel fegato</b>	
<b>Maschi</b>	+ 843,9%
<b>Femmine</b>	+ 310,8%
<b>LC3B nei reni</b>	
<b>Maschi</b>	+ 5,45%
<b>Femmine</b>	- 9,410%
<b>P62 nei reni</b>	
<b>Maschi</b>	+ 1,128%
<b>Femmine</b>	- 1,82%
<b>P53 nei reni</b>	
<b>Maschi</b>	- 26,38%
<b>Femmine</b>	+ 51,75%
<b>PARP nei reni</b>	
<b>Maschi</b>	+ 24,83%
<b>Femmine</b>	+ 59,01%

*Figura 29 Tabella riassuntiva delle differenze in percentuale del segnale d'organo del caso Brl dalla media del rispettivo CTRL dello stesso sesso.*

### Colorazione tricromica di Picro-Mallory. Analisi in parallelo di fegato e rene

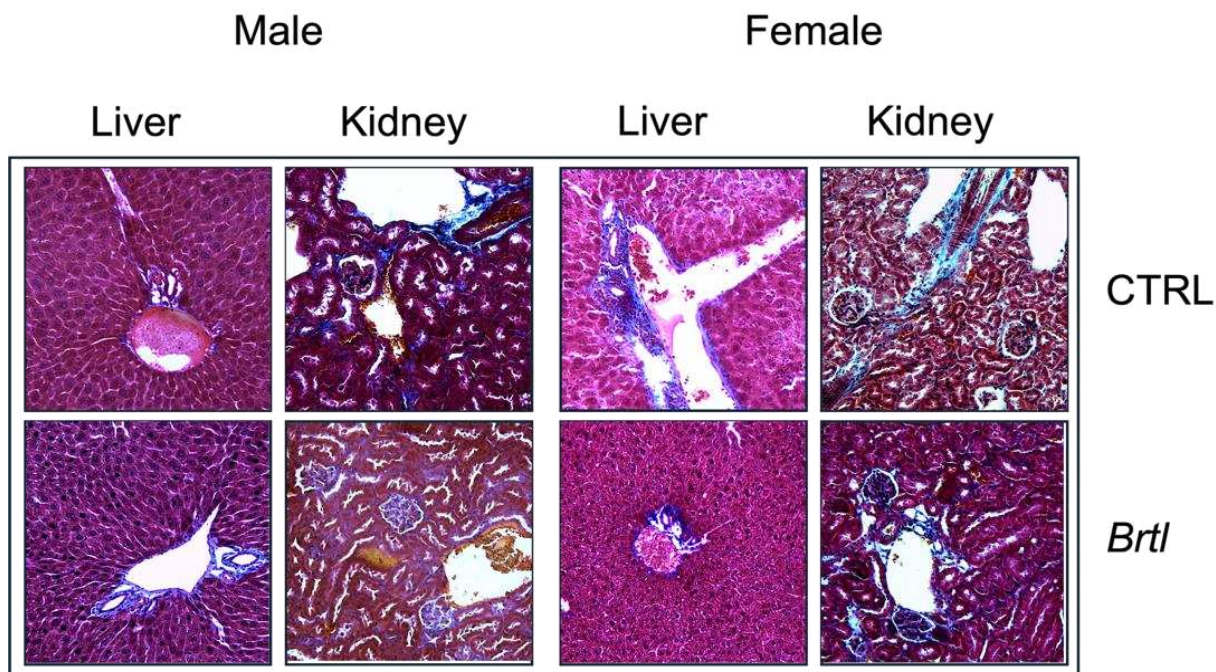


Figura 30 Colorazione Picro-Mallory per fegato e rene. Il riquadro a sinistra rappresenta i maschi, il riquadro a sinistra le femmine. Ingrandimenti (40x) a sinistra di ciascun riquadro un particolare del fegato, a destra un particolare del rene.

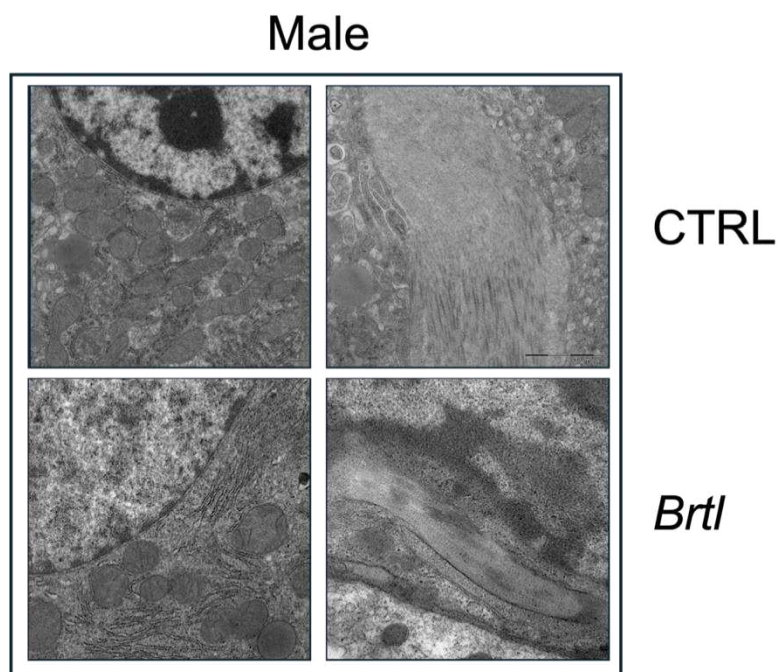
Abbiamo effettuato la colorazione di Picro-Mallory per valutare la disposizione e la composizione fibrosa associata all'endotelio nel fegato e nel rene a 12 mesi, con particolare interesse alle strutture microvascolari (sinusoidi e piccoli vasi nel fegato; capillari peritubulari e piccoli profili vascolari nel rene) e alla conservazione dell'architettura d'organo. In entrambi gli organi, la citoarchitettura complessiva è rimasta intatta: organizzazione lobulare e rete sinusoidale nel fegato; disposizione cortico-midollare, morfologia glomerulare e allineamento tubulare nel rene, indicando il mantenimento del pattern strutturale basale.

In tutti i tessuti, la colorazione Picro-Mallory ha rivelato un'attenuazione del segnale fibroso associato alle strutture endoteliali. Nel fegato, la colorazione perisinusoidale e dei piccoli vasi appariva più sottile e meno compatta rispetto ai controlli, con discontinuità locali suggestive di un ridotto rinforzo collagenoso lungo la parete sinusoidale.

Nel rene, la colorazione ha indicato una diminuzione più lieve dello spessore/compattezza apparente degli elementi fibrosi peritubulari e dei piccoli vasi, coerente con la lieve lassità

vascolare e l'assottigliamento parietale osservati dopo la processazione, senza tuttavia alterare la struttura cortico-midollare globale.

Nel complesso, il profilo transorgano indica una riduzione condivisa dello spessore fibroso associato all'endotelio nei topi *Brtl* a 12 mesi, con entità organo-specifica: più evidente lungo i sinusoidi epatici e i piccoli vasi (e concordante con la disorganizzazione del collagene a livello TEM e lo stress epatocellulare), e più lieve nei vasi renali, dove l'architettura rimane ampiamente conservata. Queste osservazioni supportano un modello di rimodellamento della matrice microvascolare rilevabile istochimicamente, pur risparmiando l'organizzazione macroscopica dei tessuti.



*Figura 31* Micrografie al TEM del tessuto epatico murino. A sinistra ingrandimento 20.000x, a destra 60.000x. In alto i controlli, in basso gli esemplari *Brtl*.

Per approfondire l'aspetto morfologico, abbiamo effettuato uno studio preliminare al TEM (*Transmission Electron Microscope*, microscopio elettronico a trasmissione, TEM JEOL JEM-1200 EXIII). Questo, ha rivelato differenze ultrastrutturali tra maschi WT di pari età e topi maschi *Brtl* a 12 mesi. Nei campioni WT, i fasci di collagene all'interno della matrice extracellulare sono ben organizzati, con bande scure nettamente delineate e regolarmente distanziate che definivano le singole fibrille. Gli organelli degli epatociti

appaiono conservati e le cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) mostrano una disposizione ordinata.

Nei fegati Brtl, si osservano piccoli focolai fibrotici più chiari, tra cui chiazze pallide intracitoplasmatiche all'interno degli epatociti e nel parenchima circostante. All'interno di queste regioni, i fasci di collagene appaiono compromessi rispetto ai WT: le fibrille sono più sottili, meno nettamente delineate e più disorganizzate, e le bande scure sono meno evidenti e più disperse, indicando una perdita del normale pattern fibrillare. Gli epatociti mostrano alterazioni degli organelli: il RER mostra un'organizzazione alterata con aree di dilatazione cisternale. I mitocondri sono strutturalmente compromessi con rigonfiamenti.

Nel complesso, i risultati TEM nei fegati maschili Brtl a 12 mesi indicano un rimodellamento della matrice extracellulare con un'architettura anomala del collagene insieme a stress epatocellulare, che colpisce sia il RER che i compartimenti mitocondriali, rispetto ai controlli maschili WT.

## DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi si è proposto di analizzare, attraverso un approccio immunohistochimico, le alterazioni cellulari e molecolari a carico di due organi extra-scheletrici: fegato e rene, nel modello murino Brtl ( $Col1a1^{+/G349C}$ ), portatore di mutazione nel gene *Col1a1*, che riproduce i tratti fenotipici dell'OI di tipo IV. Tale indagine ha voluto approfondire la natura sistemica della patologia, che, pur essendo tradizionalmente classificata come una malattia del tessuto osseo, coinvolge in realtà molteplici distretti, accomunati dalla presenza di collagene di tipo I come elemento strutturale primario (Forlino e Marini, 2016). I dati ottenuti indicano che la matrice extracellulare non è un'impalcatura passiva. La sua composizione e la sua architettura condizionano l'omeostasi cellulare, l'equilibrio autofagico, lo stress cellulare e l'organizzazione dei programmi proteostatici e di riparazione in modo tessuto-specifico e sesso-specifico.

L'obiettivo generale del lavoro è stato duplice: da un lato, verificare la presenza di alterazioni morfologiche e istologiche nei tessuti analizzati; dall'altro, valutare eventuali modificazioni dei meccanismi di autofagia, apoptosi e danno al DNA, attraverso la localizzazione e l'espressione differenziale di marker specifici quali P62, LC3B, PARP1 e P53. I risultati ottenuti sono stati discussi in un'ottica comparativa fra tessuti normali (*wild type*, CTRL) e mutati (*heterozygot type*, Brtl), con l'intento di delineare correlazioni fra la mutazione del collagene e le risposte cellulari adattative o degenerative indotte nei vari distretti d'organo. Gli organi esaminati a 12 mesi mostrano comportamenti correlati ma organo-specifici.

L'analisi morfologica dei tessuti mediante colorazioni istologiche di base (ematossilina-eosina e tricromica di Picro-Mallory) ha evidenziato nei campioni Brtl un incremento del contenuto di matrice extracellulare fibrosa, associato a un'alterata organizzazione tissutale. Nel fegato, le sezioni mutanti hanno mostrato una maggiore evidenza di depositi collagene, in particolare lungo i setti portalì e in corrispondenza dei sinusoidi, suggerendo un iniziale stato di fibrosi. Nel rene, la disposizione delle strutture glomerulari e tubulari ha mostrato segni di alterata architettura, con ispessimento della membrana basale e lieve incremento del connettivo interstiziale, coerente con una condizione subclinica di stress metabolico e strutturale.

Le analisi immunoistochimiche hanno permesso di approfondire il quadro molecolare sottostante. In particolare, il marker P62 ha mostrato un'espressione significativamente aumentata nei tessuti Brtl rispetto ai controlli, sia nei maschi sia nelle femmine, con una distribuzione citoplasmatica diffusa e accumuli perinucleari, indicativi di un'attivazione del sistema autofagico come risposta allo stress da proteine mal ripiegate. Tale evidenza è coerente con la nota patogenesi dell'OI, in cui la mutazione di COL1A1 determina l'accumulo intracellulare di collagene di tipo I anomalo, in grado di indurre una condizione cronica di stress del reticolo endoplasmatico.

Parallelamente, la positività per LC3B ha confermato un'aumentata attività autofagica nei campioni mutanti. Il pattern di colorazione, più marcato in prossimità delle zone centrolobulari epatiche e nelle cellule tubulari renali prossimali, suggerisce l'attivazione di meccanismi di compenso volti alla rimozione di aggregati proteici malripiegati o malsintetizzati. Tuttavia, l'eccessiva attivazione dell'autofagia, in particolare nelle cellule con elevato turnover metabolico, può rappresentare un meccanismo di degenerazione cellulare secondaria, laddove il flusso autofagico risulti inefficiente o incompleto.

I marker PARP1 e P53, rispettivamente associati alla risposta al danno al DNA e alla via apoptotica, hanno mostrato anch'essi un incremento di espressione nei tessuti Brtl. L'immunopositività nucleare per P53 indica un'attivazione dei meccanismi di controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi, in risposta allo stress intracellulare cronico. L'aumento della reattività per PARP1, coinvolto nei processi di riparazione del DNA e nella regolazione della morte cellulare programmata, suggerisce la concomitante presenza di fenomeni di danno ossidativo e instabilità genomica. La risposta epatica al danno al DNA aumenta in entrambi i sessi, ma è ponderata in modo diverso, verso PARP1 nei maschi e verso p53 nelle femmine (Besio et al., 2019; Gioia et al., 2017).

Complessivamente, il profilo immunoistochimico dei campioni Brtl indica l'attivazione di una complessa rete di risposte cellulari integrate (autofagia, apoptosi e riparazione del DNA) che testimoniano la presenza di un persistente stato di stress cellulare sistemico.

L'approccio utilizzato in questo studio aiuta a collegare i grafici ottenuti. Le misurazioni a campo pieno con analisi di immagine standardizzata riducono il bias dell'osservatore e consentono di leggere i cambiamenti molecolari nel contesto della disposizione dei tessuti. Questo è utile quando si associa l'istologia all'istochimica perché fornisce un ponte tra le anomalie a livello fibrillare e i pattern a livello di organo. Lo studio presenta

anche dei limiti intrinseci delle tecniche utilizzate. Le intensità allo stato stazionario non possono di per sé dimostrare il flusso autofagico; sono necessari saggi diretti con inibitori o reporter. Gli organi sono stati estratti solo da esemplari di dodici mesi; di conseguenza, i contrasti tra organi sono contestuali a questa fase dello sviluppo. Il lavoro ultrastrutturale si è concentrato sul fegato; estendendolo al rene si verificherà la generalità dei cambiamenti della matrice.

I risultati ottenuti confermano che la mutazione nel collagene di tipo I non si limita a compromettere la matrice ossea, ma esercita un impatto esteso su organi parenchimali metabolicamente attivi, come il fegato e il rene. In tali distretti, il collagene di tipo I costituisce un componente essenziale della matrice extracellulare, deputata non solo al supporto strutturale, ma anche alla regolazione della segnalazione intercellulare, della trasduzione del segnale e dell'omeostasi tissutale.

L'accumulo di collagene anomalo nel reticolo endoplasmatico delle cellule epatiche e tubulari renali, insieme alla conseguente attivazione di vie di risposta allo stress, suggerisce che l'OI debba essere considerata a pieno titolo una patologia sistemica del collagene. L'alterata qualità della matrice extracellulare induce un rimodellamento anomalo dei tessuti, promuovendo fenomeni di fibrosi, apoptosi e rigenerazione inefficace.

Nel fegato, la risposta all'accumulo di collagene e al danno ossidativo, può rappresentare l'evento iniziale di un processo fibrotico progressivo. Analogamente, nel rene, la deposizione di matrice e l'ispessimento della membrana basale glomerulare potrebbero costituire i primi segnali di una nefropatia da accumulo di proteine malripiegate.

Questi risultati suggeriscono che i meccanismi di autofagia e apoptosi osservati non rappresentano fenomeni isolati, bensì componenti di una risposta coordinata alla disfunzione proteica e all'alterazione della matrice. Tale quadro patogenetico complesso rispecchia un'immagine di stress sistemico, capace di generare un danno cumulativo a livello di più organi.

Il modello murino Brtl si conferma, alla luce dei dati ottenuti, un sistema sperimentale di elevato valore nella ricerca sull'OI. Esso riproduce fedelmente le caratteristiche cliniche e molecolari della malattia umana, offrendo la possibilità di studiare non solo le anomalie scheletriche, ma anche le manifestazioni extra-scheletriche correlate al metabolismo del collagene.

L'applicazione di tecniche immunoistochimiche e morfologiche su organi non ossei ha consentito di ampliare la prospettiva interpretativa, ponendo le basi per studi traslazionali volti all'identificazione di biomarcatori sistemici di danno tissutale. Inoltre, l'osservazione di un coinvolgimento fegato-renale apre interessanti ipotesi sull'interazione tra metabolismo del collagene, stress ossidativo e funzioni detossificanti e metaboliche.

Dal punto di vista metodologico, l'integrazione di analisi quantitative e di imaging (ad esempio, conteggio cellulare e densità di positività dei marker) rappresenta un approccio efficace per correlare i dati morfologici con i processi molecolari sottostanti. Tali strumenti, se ulteriormente affinati, potranno consentire l'identificazione di fasi precoci di danno tissutale e la valutazione dell'efficacia di strategie terapeutiche mirate, come i modulatori dell'autofagia o i correttori del folding del collagene.

Per proseguire in questo campo di ricerca sarebbe utile diramare gli studi in più ambiti per ottenere un'analisi più profonda della patologia: analizzando il danno tissutale nei vari stadi di sviluppo e in relazione al sesso, per identificare differenze di suscettibilità e di risposta cellulare; integrando con approcci omici, quali trascrittomica e proteomica, per delineare in modo più preciso le reti di segnalazione coinvolte nello stress del reticolo endoplasmatico e nella regolazione dell'autofagia; valutando approcci terapeutici innovativi, come l'uso di chaperoni molecolari, modulazione farmacologica del pathway mTOR o terapia genica basata su editing mirato dei geni *COL1A1* e *COL1A2*; confrontando con altri modelli animali, in particolare zebrafish, per esplorare la conservazione dei meccanismi cellulari e le differenze interspecifiche nella risposta al danno del collagene. Possono essere utili nella comprensione del traffico vescicolare delle analisi di flusso, con studi di immunofluorescenza in situ e maggiori studi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) per studiare il destino/comportamento delle fibre collagene modificate/malripiegate (dalla mutazione) nelle cisterne intracellulari e nello spazio extracellulare quindi, verificare se vi sono accumuli in zone specifiche, ed ampliare lo studio agli esemplari di sesso femminile.

Il lavoro qui presentato contribuisce a rafforzare la visione dell'OI come patologia multisistemica, nella quale la compromissione del collagene di tipo I altera in modo esteso l'omeostasi cellulare. L'approccio integrato di analisi morfologica e immunoistochimica applicato al modello murino *Brtl* ha permesso di evidenziare un legame diretto tra

mutazione del collagene, stress intracellulare e attivazione dei meccanismi autofagici e apoptotici.

Tali risultati, oltre a fornire un contributo conoscitivo sulla fisiopatologia della malattia, sottolineano l'importanza di considerare i distretti extra-scheletrici come parte integrante della manifestazione sistemica dell'OI. Il fegato e il rene, per la loro elevata attività metabolica e la ricchezza in collagene di tipo I, rappresentano organi sentinella sensibili alle perturbazioni della qualità proteica e della matrice extracellulare.

Infine, la comprensione dei meccanismi cellulari di risposta allo stress del collagene apre la strada a strategie terapeutiche più mirate e personalizzate, basate sulla modulazione dell'autofagia e sulla riduzione del carico proteico mal ripiegato. In questo senso, il modello Brl costituisce un valido strumento preclinico per lo sviluppo di approcci terapeutici innovativi, che possano un giorno tradursi in un miglioramento concreto della qualità di vita dei pazienti affetti da OI.

## CONCLUSIONI

Le analisi istologiche su animali di 12 mesi hanno mostrato architettura tissutale conservata in entrambi gli organi, ma con lieve lassità vascolare e riduzione della compattezza fibrosa nei topi Brtl.

La densità cellulare è risultata leggermente ridotta nei maschi e aumentata nelle femmine, suggerendo differenze sesso-dipendenti nella risposta al processamento tissutale.

Le analisi immunohistochimiche hanno evidenziato un marcato dimorfismo sessuale:

Nel fegato, i maschi Brtl presentano aumento di p62 (+48%) e LC3B (+14%), indicativi di accumulo autofagico; le femmine mostrano riduzioni di entrambi, segno di un flusso autofagico più efficiente.

I marker di danno al DNA mostrano incremento di p53 (+36% maschi, +60% femmine) e soprattutto di PARP1 (+844% maschi, +311% femmine), indicando una forte attivazione della risposta al danno con strategie diverse tra i sessi: riparazione basata su PARP1 nei maschi, checkpoint p53-dipendente nelle femmine.

Nel rene, l'autofagia mostra un pattern simile ma attenuato (p62 +1%, LC3B +5% nei maschi; entrambi ridotti nelle femmine), mentre la risposta al danno del DNA evidenzia p53 ridotto nei maschi (-26%) e aumentato nelle femmine (+52%), con PARP1 aumentato in entrambi.

La colorazione Picro-Mallory conferma una riduzione del collagene perivascolare, più marcata nel fegato che nel rene, senza alterazioni macroscopiche dell'architettura tissutale.

Nel complesso, lo studio mostra che nei topi Brtl l'OI induce rimodellamento microvascolare e alterazioni autofagiche e genotossiche sesso-specifiche, più pronunciate nel fegato. Queste differenze suggeriscono una diversa strategia di adattamento cellulare tra maschi e femmine in risposta allo stress da collagene mutato, confermando l'importanza di analizzare l'OI in un'ottica organo- e sesso-dipendente.

## BIBLIOGRAFIA

- Ba, X., & Garg, N. J. (2011). Signaling mechanism of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in inflammatory diseases. *The American journal of pathology*, 178(3), 946–955. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.12.004>.
- Berkers, Celia R., Oliver D.K. Maddocks, Eric C. Cheung, Inbal Mor, e Karen H. Vousden. «Metabolic Regulation by p53 Family Members». *Cell Metabolism* 18, fasc. 5 (2013): 617–33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.019>.
- Besio, Roberta, Chi-Wing Chow, Francesca Tonelli, Joan C. Marini, e Antonella Forlino. «Bone Biology: Insights from Osteogenesis Imperfecta and Related Rare Fragility Syndromes». *The FEBS Journal* 286, fasc. 15 (2019): 15. <https://doi.org/10.1111/febs.14963>.
- Chen, Frieda, Ruolin Guo, Shousaku Itoh, et al. «First Mouse Model for Combined Osteogenesis Imperfecta and Ehlers-Danlos Syndrome». *Journal of Bone and Mineral Research* 29, fasc. 6 (2014): 1412–23. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2177>.
- Besio, Roberta, Nadia Garibaldi, Laura Leoni, et al. «Cellular Stress Due to Impairment of Collagen Prolyl Hydroxylation Complex Is Rescued by the Chaperone 4-Phenylbutyrate». *Disease Models & Mechanisms*, 1 gennaio 2019, dmm.038521. <https://doi.org/10.1242/dmm.038521>.
- Chen, Y., Yi, H., Liao, S., He, J., Zhou, Y., & Lei, Y. (2025). LC3B: A microtubule-associated protein influences disease progression and prognosis. *Cytokine & growth factor reviews*, 81, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.11.006>.
- Daley, Ethan, Elizabeth A Streeten, John D Sorkin, et al. «Variable bone fragility associated with an Amish COL1A2 variant and a knock-in mouse model». *Journal of Bone and Mineral Research* 25, fasc. 2 (2010): 247–61. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090720>.

Dietrich, K., Fiedler, I. A., Kurzyukova, A., López-Delgado, A. C., McGowan, L. M., Geurtzen, K., Hammond, C. L., Busse, B., & Knopf, F. (2021). Skeletal Biology and Disease Modeling in Zebrafish. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 36(3), 436–458. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4256>.

Dinulescu, Alexandru, Alexandru-Sorin Păsărică, Mădălina Carp, et al. «New Perspectives of Therapies in Osteogenesis Imperfecta—A Literature Review». *Journal of Clinical Medicine* 13, fasc. 4 (2024): 4. <https://doi.org/10.3390/jcm13041065>.

Forlino, Antonella, Forbes D. Porter, Eric J. Lee, Heiner Westphal, e Joan C. Marini. «Use of the Cre/Lox Recombination System to Develop a Non-Lethal Knock-in Murine Model for Osteogenesis Imperfecta with an A1(I) G349C Substitution». *Journal of Biological Chemistry* 274, fasc. 53 (1999): 53. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37923>.

Garibaldi, Nadia, Roberta Besio, Raymond Dalgleish, et al. «Dissecting the Phenotypic Variability of Osteogenesis Imperfecta». *Disease Models & Mechanisms* 15, fasc. 5 (2022): 5. <https://doi.org/10.1242/dmm.049398>.

Gioia, R., Tonelli, F., Ceppi, I., Biggiogera, M., Leikin, S., Fisher, S., Tenedini, E., Yorgan, T. A., Schinke, T., Tian, K., Schwartz, J. M., Forte, F., Wagener, R., Villani, S., Rossi, A., & Forlino, A. (2017). The chaperone activity of 4PBA ameliorates the skeletal phenotype of Chihuahua, a zebrafish model for dominant osteogenesis imperfecta. *Human molecular genetics*, 26(15), 2897–2911. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx171>.

Gistelinck, Charlotte, Ronald Y. Kwon, Fransiska Malfait, et al. «Zebrafish type I collagen mutants faithfully recapitulate human type I collagenopathies». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, fasc. 34 (2018): E8037–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722200115>.

Gómez-Virgilio, L., Silva-Lucero, M. D., Flores-Morelos, D. S., Gallardo-Nieto, J., Lopez-Toledo, G., Abarca-Fernandez, A. M., Zacapala-Gómez, A. E., Luna-Muñoz, J., Montiel-Sosa, F., Soto-Rojas, L. O., Pacheco-Herrero, M., & Cardenas-Aguayo, M. D. (2022). Autophagy: A Key Regulator of Homeostasis and Disease: An Overview of Molecular Mechanisms and Modulators. *Cells*, 11(15), 2262.  
<https://doi.org/10.3390/cells11152262>.

Hald, Jannie Dahl, Bente Langdahl, Lars Folkestad, et al. «Osteogenesis Imperfecta: Skeletal and Non-Skeletal Challenges in Adulthood». *Calcified Tissue International*, pubblicazione online ad accesso anticipato, 5 giugno 2024.  
<https://doi.org/10.1007/s00223-024-01236-x>.

Huang, R., & Liu, W. (2015). Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy. *Autophagy*, 11(5), 852–853.  
<https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1038016>.

Hwang, Hyun Jung, Hongseok Ha, Ban Seok Lee, Bong Heon Kim, Hyun Kyu Song, e Yoon Ki Kim. «LC3B is an RNA-binding protein to trigger rapid mRNA degradation during autophagy». *Nature Communications* 13, fasc. 1 (2022): 1436.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29139-1>.

Kastenhuber, Edward R., e Scott W. Lowe. «Putting p53 in Context». *Cell* 170, fasc. 6 (2017): 1062–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>.

Marini, Joan C., e Angela R. Blissett. «New Genes in Bone Development: What’s New in Osteogenesis Imperfecta». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98, fasc. 8 (2013): 8. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1505>.

Marini, Joan C., Antonella Forlino, Hans Peter Bächinger, et al. «Osteogenesis Imperfecta». *Nature Reviews Disease Primers* 3, fasc. 1 (2017): 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.52>.

Morales, J., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., Gao, J., & Boothman, D. A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 24(1), 15–28.

<https://doi.org/10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2013006875>.

Ovalle, W.K., e P.C. Nahirney. *Netter's Essential Histology: with Student Consult Access*. Netter Basic Science. Elsevier Health Sciences, 2013.

<https://books.google.it/books?id=toBDtreNf9cC>.

Nieto-Torres, J. L., Encalada, S. E., & Hansen, M. (2021). LC3B phosphorylation: autophagosome's ticket for a ride toward the cell nucleus. *Autophagy*, 17(10), 3266–3268. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1961073>.

Tonelli, Francesca, Jan Willem Bek, Roberta Besio, et al. «Zebrafish: A Resourceful Vertebrate Model to Investigate Skeletal Disorders». *Frontiers in Endocrinology* 11 (luglio 2020): 489. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00489>.

Treuting, P.M., S.M. Dintzis, e K.S. Montine. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. Academic Press, 2017.

<https://books.google.it/books?id=FgBQCwAAQBAJ>.

Wang, Haolan, Ming Guo, Hudie Wei, e Yongheng Chen. «Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8, fasc. 1 (2023): 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01347-1>.

Wu M, Cronin K, Crane JS. Biochemistry, Collagen Synthesis. 2023 Sep 4. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–. PMID: 29939531