



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA**  
**"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA GENERALE

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA SPERIMENTALE  
XX CICLO

Titolo della tesi:

Rimodellamento dei complessi giunzionali dei  
cardiomiociti nelle cardiomiopatie: dal modello  
sperimentale all'uomo

Dottoranda: PAOLA TRONO

Docente Guida: Prof. Andrea Modesti

Coordinatore: Prof. Renato Lauro

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	pag 3
Cardiomiopatie	pag 15
Modelli sperimentali di cardiomiopatia:	
criceti UM-X7 e TO2	pag 19
Acidi grassi $\omega$ -3 e dieta:	
effetti antinfiammatori e cardio-protettivi	pag 21
Acidi grassi $\omega$ -3 e cardiomiopatie	pag 24
Scopo dello studio	pag 25
<b>MATERIALI E METODI</b>	
Modello animale e dieta	pag 26
Western blotting	pag 27
Immunoperossidasi	pag 28
Analisi ultrastrutturale e istopatologica	pag 29
Analisi statistica	pag 29
<b>RISULTATI I</b>	pag 30
<b>RISULTATI II</b>	pag 33
Tabelle e figure	pag 36
<b>DISCUSSIONE I</b>	pag 51
<b>DISCUSSIONE II</b>	pag 56
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag 60

## INTRODUZIONE

Il tessuto muscolare cardiaco costituisce lo strato della parete cardiaca detto miocardio, responsabile della contrazione del cuore. Il miocardio è caratterizzato da un arrangiamento tridimensionale di cardiomiociti mono o binucleati, di origine mesodermica, caratterizzati nelle prime fasi dello sviluppo da marcatori di differenziazione epiteliale, e connessi gli uni agli altri da vari tipi di giunzioni che nel cuore maturo costituiscono i dischi intercalari (Pieperhoff and Franke 2007). Il processo di contrazione cardiaca richiede l'esistenza di robuste giunzioni intercellulari responsabili dell'accoppiamento fisico tra i cardiomiociti; queste vanno a formare complessi elaborati localizzati alla estremità delle singole cellule che costituiscono appunto i dischi intercalari (Pieperhoff and Franke 2007). I dischi intercalari costituiscono un sistema complesso ed esteso di giunzioni che realizzano l'accoppiamento meccanico ed elettrochimico fra le cellule dell'apparato contrattile (Goossens et al. 2007).

La struttura del disco intercalare, combinando elementi mesenchimali-muscolari con elementi epiteliali, fornisce ancoraggio per i fasci di miofibre e permette la neutralizzazione delle relative contrazioni, oltre che garantire coerenza ed adesione intercellulare (Franke et al. 2007); è un sistema giunzionale costituito da tre grossi complessi: le giunzioni aderenti, i desmosomi e le giunzioni comunicanti (Forbes and Sperelakis 1985). Le giunzioni aderenti garantiscono una forte adesione cellula-cellula, mediata dal legame del complesso caderina-catenina all'actina citoscheletrica (Gumbiner 2000); i desmosomi forniscono un ulteriore supporto strutturale, attraverso l'interazione delle caderine desmosomiali ai filamenti intermedi (Huber 2003); le giunzioni comunicanti realizzano l'accoppiamento di cellule adiacenti poichè sono costituite da un'aggregazione di canali attraverso cui si

realizza il passaggio di piccole proteine regolatorie e ioni (Giepmans 2004).

Recentemente è stato coniato il termine di “area composita” per il disco intercalare in riferimento al fatto che possa essere descritto come un mosaico di differenti elementi giunzionali, piuttosto che come un sistema unico di giunzione (Pieperhoff and Franke 2007). Tale area composita non sarebbe rintracciabile nelle fasi iniziali dello sviluppo del tessuto cardiaco nei vertebrati, ma comparirebbe in fase più tardiva, durante lo sviluppo postnatale dell’organo (Pieperhoff and Franke 2007); dall’analisi dell’arrangiamento delle giunzioni del disco intercalare durante lo sviluppo dell’organo cardiaco in topo, è risultato evidente che i caratteri distintivi dei due tipi di giunzioni originariamente presenti, desmosomi e giunzioni aderenti, vengono persi nel cuore maturo dove queste regioni di giunzione appaiono strettamente ravvicinate a formare quasi una “super struttura” continua in cui i due elementi molecolari risultano fusi a mosaico (Pieperhoff and Franke 2007).

Le giunzioni aderenti sono responsabili dell’accoppiamento meccanico tra i cardiomiociti e sono localizzate a ridosso delle giunzioni comunicanti. Le proteine che costituiscono le giunzioni aderenti sono le caderine, le catenine e altre proteine correlate alle catenine, come la vinculina e la alfa-actina (Gutstein et al. 2003). Le caderine sono proteine transmembrana responsabili dell’adesione omofila cellula-cellula calcio-dipendente; ne esistono diverse isoforme, tra cui le P, E ed N caderine. Vengono sintetizzate sotto forma di polipeptidi precursori che vanno incontro a varie modificazioni post-traduzionali, come glicosilazione, fosforilazione e taglio proteolitico (Sheikh et al. 2006). La porzione citoplasmatica altamente conservata delle caderine

interagisce con le catenine, le quali connettono le caderine all'actina citoscheletrica.

Diversi studi hanno dimostrato che la N-caderina svolge un ruolo importante nella differenziazione dei cardiomiociti e nella genesi del sarcomero durante lo sviluppo cardiaco (Soler and Knudsen 1994; J et al. 2005) inoltre le giunzioni aderenti costituite da N-caderina promuovono la formazione del disco intercalare e ne garantiscono la integrità strutturale. Difetti nelle giunzioni aderenti hanno effetti gravi sulla organizzazione e funzionalità sia dei desmosomi che delle giunzioni comunicanti; è stato dimostrato che la delezione cardiaco-specifica della N-caderina nel cuore adulto provoca un rimodellamento importante del disco intercalare e causa alterazioni di conduzione (J et al. 2005).

Le alfa-catenine sono le molecole chiave del complesso di adesione cellulare mediato dalle caderine. Nel modello classico di giunzione aderente, le alfa-catenine ancorano il complesso caderina-catenina alla actina citoscheletrica mediante il legame alle proteine armadillo e/o placoglobina da un lato, e con i filamenti di actina dall'altro. Recentemente è stata avanzata l'ipotesi che le alfa-catenine stabilizzino i contatti cellula-cellula agendo da regolatori molecolari delle dinamiche dell'actina a livello della giunzione aderente (Yamada et al. 2005).

Le alfa-catenine attualmente conosciute sono tre: la alfa E-catenina, espressa in maniera ubiquitaria (Herrenknecht et al. 1991), la alfa N-catenina, neuronale, (Hirano et al. 1992) e la alfa T-catenina, che mostra un ristretto pattern di espressione, abbondante soprattutto nel tessuto cardiaco e in minor quantità nel muscolo scheletrico e nel cervello.

I desmosomi sono giunzioni adesive intercellulari presenti negli epiteli e nel muscolo cardiaco e ancorano i filamenti intermedi del citocheletro alla membrana citoplasmatica. Oltre che conferire resistenza alla struttura dei tessuti, i desmosomi partecipano anche ai processi di morfogenesi e differenziazione (Syrris et al. 2006). Le proteine del desmosoma appartengono a tre principali famiglie: le plachine, le proteine armadillo e le caderine.

Le caderine desmosomiali, le desmocolline e le desmogleine sono glicoproteine di membrana di tipo I responsabili dell'adesione cellulare. Le desmocolline si legano alle desmogleine mediante i domini extracellulari, mentre i domini citoplasmatici presentano siti di legame per la placoglobina che è l'unica proteina presente sia a livello delle giunzioni aderenti classiche che nei desmosomi (Zhurinsky et al. 2000; Bonne et al. 2003).

Le placofilline sono membri della famiglia delle proteine armadillo; possono interagire con diversi elementi del complesso, come le desmogleine, le desmocolline, le desmoplachine, la placoglobina e i filamenti intermedi cheratinici. Per questo si ritiene che le placofilline fungano da collante a livello della placca di desmosoma (Bonne et al. 2003).

Le giunzioni comunicanti (gap junction) sono costituite dall'aggregamento di canali che consentono il passaggio di ioni e molecole del segnale fra cellule adiacenti (Giepmans 2004).

Nei mammiferi le giunzioni comunicanti sono costituite da proteine integrali di membrana della famiglia genica delle connesine, cruciali per la regolazione dello sviluppo embrionale, la contrazione coordinata delle cellule eccitabili, l'omeostasi tissutale, la crescita e la differenziazione cellulare (Saez et al. 2003) (Sohl et al. 2004). Durante la formazione dei canali intercellulari, sei connesine si organizzano a

formare un emicanale, o connessione; successivamente i connessioni vengono trasportati in membrana secondo meccanismi ancora poco conosciuti. Un canale funzionale si forma dalla giustapposizione di due emicanali opposti su due cellule adiacenti; così assemblato, il canale consente la diffusione di ioni, aminoacidi, secondi messaggeri e altri metaboliti fra il citoplasma delle due cellule adiacenti (White and Paul 1999; Sohl et al. 2004).

Un connesone può essere formato da connesine diverse (eteromero) oppure congiungersi ad un connesone formato da un tipo di connesina differente (eterotipico).

Il genoma umano contiene almeno 21 geni codificanti per le connesine, di queste 5 sono espresse nel tessuto cardiaco; i cardiomiociti esprimono maggiormente le connesine Cx43, Cx40 e Cx45 in combinazioni caratteristiche e in quantità relative che variano secondo il tipo di miocita, la localizzazione a livello del miocardio e lo stadio di sviluppo (Alcolea et al. 2004). La connesina 43 è il tipo predominante, ed è espressa dai cardiomiociti ventricolari ed atriali, in tutti i mammiferi. Le connesine 40 e 45 sono espresse a minori livelli, la connesina 40 è espressa a livello del tessuto atriale, la connesina 45, invece, sembra essere limitata al tessuto nodale.

I cardiomiociti del ventricolo adulto sono interconnessi da raggruppamenti di giunzioni comunicanti costituiti da connesina 43 strettamente organizzate con desmosomi e giunzioni aderenti, a livello dei dischi intercalari. L'organizzazione delle giunzioni comunicanti e le caratteristiche strutturali del tessuto, come per esempio la forma e la grandezza delle cellule, sono determinanti nel garantire la propagazione dell'impulso secondo l'asse longitudinale e permettere la diffusione anisotropa dell'impulso, tipica del ventricolo sano (Severs et al. 2006).

I cardiomiociti atriali sono cellule dalla forma allungata rispetto alla controparte ventricolare e mostrano dischi intercalari più corti e strutturalmente meno complessi. Le giunzioni comunicanti dei cardiomiociti atriali della maggior parte dei mammiferi, compreso l'uomo, contengono la connessina 40 (Cx40), colocalizzata con la connessina Cx43, all'interno della stessa placca di giunzione. La connessina 45, come anche nel ventricolo, è presente in piccole quantità (Severs et al. 2006).

I cardiomiociti del sistema di generazione e conduzione dell'impulso differiscono rispetto a quelli atriali e ventricolari sia per morfologia, che per profilo di espressione di connessine. Nei modelli sperimentali, i cardiomiociti del nodo senoatriale e del nodo atrioventricolare mostrano piccole e disperse giunzioni comunicanti composte dalla connessina 45, che, come è noto da studi in vitro, dà origine a canali a bassa conduttanza; questo accoppiamento debole tra i cardiomiociti rimanda al ruolo che il nodo atrioventricolare svolge nel rallentamento della conduzione, col fine di garantire la corretta contrazione sequenziale di atri e ventricoli.

Numerosi sono gli studi che indagano il ruolo che eventuali alterazioni della organizzazione delle giunzioni o della espressione di connessine potrebbero avere in fenomeni di malfunzionamento cardiaco.

L'aberrante funzionamento delle giunzioni comunicanti può in teoria derivare o da difetti primari (dovuti per esempio a mutazioni) o da malformazioni che si sviluppano nel corso della vita (Severs et al. 2006).

E' noto che mutazioni in geni codificanti proteine delle giunzioni comunicanti causano un gran numero di patologie umane, e sono correlate ad alcune forme di malformazioni congenite del cuore (Dasgupta et al. 1999).



Distinte dalle alterazioni primarie, sono invece le alterazioni a livello della organizzazione e della espressione delle giunzioni comunicanti che possono emergere nel corso della vita, e che sono associate ad alcune patologie cardiache adulte.

Le principali alterazioni che coinvolgono le giunzioni comunicanti possono essere di due tipi: quelle a livello della distribuzione dei complessi di giunzione e quelle caratterizzate invece da una riduzione dei livelli della connessina 43 (Severs et al. 2006).

Alterazioni nella distribuzione delle giunzioni comunicanti sono state riportate per la prima volta a livello dei cardiomiociti confinanti la zona infartuata in ventricoli di pazienti ischemici (Smith et al. 1991); le zone infartuate mostravano estese aree fibrotiche, mentre le zone distanti rivelavano un ordinato arrangiamento delle miofibre, con una struttura generale che richiama quella del miocardio normale. A livello dei cardiomiociti posti immediatamente a ridosso della zona infartuata, invece, erano evidenti alcune alterazioni importanti: disallineamento delle fibre, riduzione del contenuto in miofibrille, alterazione della forma e grandezza cellulari, e in alcuni casi anche aumento delle dimensioni del nucleo. A livello dei dischi intercalari, si osservava una dispersione della connessina 43 a livello della superficie laterale del cardiomiocita; è noto che la velocità di conduzione dell'impulso è influenzata dall'orientamento dei cardiomiociti, e che la conduzione parallela all'asse longitudinale della cellula è più rapida rispetto a quella trasversale e questo effetto è in parte mediato dalle giunzioni comunicanti; queste considerazioni avevano portato ad ipotizzare che la delocalizzazione di connessina 43 osservata potesse provocare un'alterazione delle normali proprietà di conduzione tra i cardiomiociti e contribuire all'insorgenza di aritmie (Smith et al. 1991). È stata rilevata una disorganizzazione delle giunzioni anche in modello

sperimentale di ratto in seguito ad infarto da legatura coronarica [(Matsushita et al. 1999): durante la fase iniziale di infarto del miocardio, è riportata una alterazione nella conduzione intercellulare causata da una drastica diminuzione di giunzioni comunicanti; il ritardo nella conduzione in specifiche aree del miocardio provoca l'instaurarsi di aritmie; durante la fase acuta, si assiste ad una dispersione delle giunzioni comunicanti a livello della superficie laterale dei cardiomiociti, e questo causa un'anormale conduzione a livello delle zone confinanti con la zona infartuata (Luke and Saffitz 1991; Matsushita et al. 1999). In ventricolo di cane, gli effetti a lungo termine del rimodellamento del miocardio, distante dalla zona infartuata, comprendono riduzione delle giunzioni comunicanti sia in grandezza che in numero, per unità di lunghezza del disco intercalare, e minor numero di giunzioni intercellulari (Luke and Saffitz 1991).

Una lateralizzazione di connessina 43 è stata riportata anche in pazienti affetti da ipertrofia compensatoria, dovuta a stenosi dell'aorta (Kostin et al. 2004) e in pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa e miocarditi (Kostin et al. 2003); un'alterata distribuzione di connessina 43 è stata rinvenuta sia in cardiomiociti delimitanti piccole aree di fibrosi interstiziale in pazienti con cardiomiopatia dilatativa, sia nelle aree di infiammazione in pazienti con cardiomiopatie infiammatorie. In entrambi i casi si nota la presenza di pochi cardiomiociti ancora vitali, immersi nel tessuto fibroso o infiammatorio e capaci di stabilire connessioni intercellulari grazie alla presenza di giunzioni comunicanti, ancora strutturalmente intatte, ma disperse e con un anomalo pattern di distribuzione di connessina 43 (Kostin et al. 2003).

Il disarrangiamento delle giunzioni comunicanti a livello del ventricolo è stato rinvenuto anche in corso di cardiomiopatia ipertrofica (Sepp et al. 1996), dove appare confinato alle zone caratterizzate da una

completa disorganizzazione delle fibre; la dispersione della connessina 43 a livello della superficie laterale dei cardiomiociti contribuisce alla alterazione delle proprietà meccaniche ed elettriche del miocardio in corso di cardiomiopatia ipertrofica, e crea un substrato morfologico per la generazione e propagazione di aritmia (Sepp et al. 1996): simili alterazioni sono state descritte in criceti cardiomiopatici (Luque et al. 1994).

Un'altra forma di rimodellamento strutturale è rinvenibile nel cosiddetto miocardio umano ibernante; il termine di miocardio ibernante si riferisce a regioni del miocardio in pazienti ischemici, che mostrano malfunzionamento nella contrazione ma che recuperano la funzione contrattile dopo by-pass coronario. Nel miocardio ibernante, alla periferia dei dischi intercalari, le grandi giunzioni comunicanti di connessina 43 mostrano una evidente riduzione di grandezza rispetto alle regioni temporaneamente ischemiche e normalmente perfuse, dello stesso cuore [(Kaprielian et al. 1998).

Il rimodellamento strutturale porta inevitabilmente ad una disorganizzazione del pathway di microconduzione, e una distribuzione eterogenea caratterizzata per esempio da riduzioni focali di connessina 43, come osservato nel miocardio ischemico e ibernante, può in teoria contribuire alla generazione di difetti della conduzione e malfunzionamenti del processo di contrazione (Severs et al. 2006).

Queste osservazioni avvalorano la tesi secondo cui il rimodellamento di connessina 43 a livello delle giunzioni comunicanti è correlato al malfunzionamento ventricolare in patologie cardiache.

Saffitz et al. hanno studiato un gruppo di cardiomiopatie causate da mutazioni in geni codificanti proteine che svolgono funzioni critiche a livello delle giunzioni di adesione cellula-cellula. Queste cardiomiopatie, definite cardiomiopatie della giunzione cellula-cellula,

sono causate da mutazioni in proteine intracellulari che connettono le molecole di adesione alle giunzioni aderenti e i desmosomi al citoscheletro (Saffitz et al. 2007). Tra i geni coinvolti ci sono quelli codificanti la desmoplachina, la placoglobina e la plachofilina 2. Queste mutazioni mostrano pattern di eredità sia dominante che recessiva, e sono associate alla manifestazione clinica di cardiomiopatia del ventricolo destro o a cardiomiopatia dilatativa. Un aspetto comune delle cardiomiopatie di giunzione cellula-cellula è dato dall'alta incidenza di sincope, aritmie ventricolari e improvviso arresto cardiaco (Saffitz et al. 2007).

Questo suggerisce che alterazioni della adesione intercellulare causate da difetti delle giunzioni cellula-cellula, possono creare un substrato anatomico che favorisce lo sviluppo di aritmie ventricolari (Saffitz et al. 2007).

Il rimodellamento delle giunzioni comunicanti può anche essere caratterizzato da alterazioni dell'espressione di connessina 43. E' stato documentato che nel ventricolo sinistro di pazienti trapiantati all'ultimo stadio di malfunzionamento cardiaco, sia per cardiomiopatia dilatativa, ischemica o per stenosi dell'aorta, si rileva una significativa riduzione dei livelli di connessina 43, che si instaura progressivamente durante il corso della patologia, probabilmente preceduta da un provvisorio aumento della proteina, da interpretare come iniziale risposta adattativa ad una fase precoce di ipertrofia compensatoria.

E' importante considerare che il livello totale di connessina può dare un'indicazione dell'accoppiamento dei cardiomiociti, ma non è necessariamente correlato alla quantità di canali funzionanti. Questo, insieme alla considerazione fatta sulla base di predizioni computazionali, secondo cui una riduzione fino al 40% del contenuto delle giunzioni comunicanti, può non avere effetti significativi sulla

velocità di conduzione, suggerisce che le alterazioni quantitative di connessina debbano essere considerate in un contesto di rimodellamento cardiaco per poter essere considerate indicative di un malfunzionamento dell'organo (Severs et al. 2006).

Topi knockout per la connessina 43 muoiono poco tempo dopo la nascita a causa di malformazione del cono che causa ostruzione del tratto di efflusso ventricolare destro, i cuori di neonati omozigoti mostrano abbassamento della velocità di conduzione ventricolare (Guerrero et al. 1997). Negli animali adulti eterozigoti, che invece sopravvivono senza apparenti anomalie, la riduzione del 50% della quantità di connessina 43, produce una riduzione di comparabile intensità nella velocità di conduzione (Guerrero et al. 1997).

E' stato caratterizzato un modello murino di cardiomiopatia umana desmina-correlata, caratterizzato dall'espressione cardiaco-ristretta del gene codificante la desmina che porta una delezione di sette aminoacidi (Saffitz et al. 2007). Il topo esibisce aspetti tipici della patologia umana, tra cui l'accumulo intracellulare di desmina, la discontinuità del network di filamenti di desmina e un disallineamento delle miofibrille (Wang et al. 2001). A livello dei dischi intercalari, è stata evidenziata una diminuzione di tre volte di connessina 43 dovuta a diminuzione sia del numero che di dimensione delle giunzioni comunicanti. Analisi mediante tecniche di immunoblotting hanno evidenziato però che non c'è una diminuzione del livello di contenuto totale della proteina; questo suggerisce che la diminuzione di connessina 43 a livello dei dischi intercalari non è dovuta ad una bassa espressione della proteina, ma alla incapacità della proteina di assemblarsi propriamente a livello delle giunzioni meccaniche (Saffitz et al. 2007).

In un modello di topo transgenico di cardiomiopatia dilatativa a 4 settimane dalla nascita appare evidente una riduzione in connessina 43,

seguita da disfunzione dell'apparato contrattile e collasso cardiaco a 12 settimane (Hall et al. 2000).

In cuori isolati di topi transgenici esprimenti la metà del contenuto normale di connessina, l'ischemia sperimentale porta ad un significativo aumento della incidenza, frequenza e durata della tachicardia ventricolare, mentre la riduzione della velocità di conduzione risulta modesta (Lerner et al. 2000). Inoltre, topi transgenici generati con una specifica assenza di connessina 43 a livello cardiaco, non vanno incontro a morte improvvisa dovuta ad aritmia ventricolare se non quando si raggiunge una riduzione in connessina 43 variabile tra 86-95% (Gutstein et al. 2001).

## CARDIOMIOPATIE

Le cardiomiopatie sono patologie del cuore associate a disfunzione cardiaca. Vengono classificate secondo criteri morfologici e funzionali in quattro categorie: cardiomiopatia ipertrofica, cardiomiopatia dilatativa, displasia ventricolare aritmogenica destra e cardiomiopatia restrittiva (Fatkin and Graham 2002). Le cardiomiopatie possono instaurarsi come disordini primari o svilupparsi come conseguenza a una varietà di condizioni, come ischemia miocardica, infiammazione, infezione, aumentata pressione del miocardio e agenti tossici. La patogenesi delle cardiomiopatie primarie non è del tutto nota. Negli ultimi dieci anni è però emersa l'importanza di difetti genici e il ruolo che essi svolgono nella eziologia delle cardiomiopatie primarie (Fatkin and Graham 2002).

La cardiomiopatia ipertrofica è una patologia primaria del miocardio che mostra carattere di ereditarietà autosomica dominante ed è caratterizzata da ipertrofia del ventricolo; le caratteristiche istologiche predominanti sono la ipertrofia dei cardiomiociti, il disarrangiamento delle miofibrille, la fibrosi interstiziale. La cardiomiopatia ipertrofica è causa frequente di morte improvvisa, soprattutto in individui giovani e in atleti. Alcuni individui rimangono asintomatici per tutta la vita; altri, invece, sviluppano progressivamente la sintomatologia classica. La diagnosi di cardiomiopatia ipertrofica in genere richiede l'esclusione di cause secondarie di ipertrofia, come stenosi dell'aorta o ipertensione (Kubo et al. 2007).

La cardiomiopatia ipertrofica è una patologia geneticamente eterogenea, al momento sono stati individuati 12 loci cromosomici correlati, di cui 10 codificano proteine sarcomeriche. Nell'ultima decade virtualmente tutte le proteine che compongono il sarcomero sono state implicate nella patogenesi della cardiomiopatia ipertrofica,

includere la myosin binding protein C (MYBPC), la catena leggera della miosina regolatoria (MLC-1), la troponina cardiaca T (cTnT), la troponina cardiaca I (cTnI), l'alfa-tropomiosina, l'actina e la titina (Kubo et al. 2007). Questo ha portato a considerare la cardiomiopatia ipertrofica come una patologia del sarcomero (Thierfelder et al. 1994) (Watkins et al. 1995). Il fatto che la cardiomiopatia ipertrofica sia caratterizzata da mutazioni delle proteine del sarcomero, ha portato a credere che l'ipertrofia del ventricolo, più che una manifestazione primaria, si sviluppi come una risposta compensatoria a disfunzioni del sarcomero (Bonne et al. 1995) (Taki et al. 1994; Franz et al. 2000).

La cardiomiopatia dilatativa è la patologia del miocardio caratterizzata da dilatazione cardiaca e disfunzione contrattile dei ventricoli. Gli agenti eziologici possono essere diversi, ma nel 50% dei casi, non è possibile individuare una causa specifica, e pertanto si parla di cardiomiopatia dilatativa idiopatica (Ellis and Di Salvo 2007). Studi condotti su famiglie affette da cardiopatia dilatativa, hanno rivelato modalità di ereditarietà autosomica dominante, autosomica recessiva, e legata al cromosoma X. Si tratta di una patologia geneticamente eterogenea, in cui il primo gene ad essere identificato in analisi di linkage è stato quello codificante l'actina cardiaca. Successivamente sono state individuate mutazioni negli stessi geni che appaiono mutati nella cardiomiopatia ipertrofica, come quelli codificanti la MYBPC, la MLC-1, la cTnT e la titina; mentre mutazioni esclusive della cardiomiopatia dilatativa sono quelle che coinvolgono alcune proteine del citoscheletro, come la desmina, il delta-sarcoglicano e la metavinculina (Gerull et al. 2006; Murakami et al. 2006).

Successivamente alla scoperta che la cardiomiopatia ipertrofica fosse causata da mutazioni di proteine sarcomeriche, è stata avanzata l'ipotesi della cosiddetta trasmissione di forza difettiva, che si basa



sulla nozione che il citoscheletro fornisce un'impalcatura intracellulare importante per la trasmissione di forza dal sarcomero alla matrice extracellulare e per la protezione del cardiomiocita da stress meccanici esterni. Mutazioni quindi a livello delle proteine citoscheletriche predispongono alla cardiomiopatia dilatativa, poiché riducono la trasmissione di forza e la protezione contro insulti esterni. L'identificazione di mutazioni in geni che codificano l'actina cardiaca, la desmina, la metavinculina, il delta-sarcoglicano e la distrofina, hanno perciò supportato la tesi della difettiva trasmissione di forza, anche per la cardiomiopatia dilatativa. D'altra parte la disfunzione cardiaca può generare dagli effetti che la stessa proteina mutata provoca, o dagli effetti provocati da una anomala interazione della proteina mutata con altre proteine. Per esempio è stata descritta una mutazione a livello del gene della distrofina che codifica una proteina tronca che assume una conformazione alterata, causa di un mal assemblamento del complesso del delta-sarcoglicano (Franz et al. 2000).

Comunque il meccanismo che determina il malfunzionamento cardiaco e risulta in ipertrofia ventricolare o dilatazione della camera, rimane ancora non chiaro. Da un punto di vista funzionale, nella cardiomiopatia dilatativa è colpita la performance sistolica, in quella ipertrofica, la performance diastolica (Fatkin and Graham 2002).

La displasia ventricolare destra aritmogena è una patologia primaria cardiaca caratterizzata da morte dei cardiomiociti per necrosi o apoptosi, con conseguente rimpiazzamento di tessuto adiposo e fibroso (Thiene et al. 2007). Questo processo riguarda principalmente il ventricolo destro e può avere una distribuzione focale o diffusa, con progressiva dilatazione della camera e ispessimento del setto. Studi di linkage hanno dimostrato che la displasia ventricolare destra

aritmogenica è una patologia genetica, e al momento sono stati individuati sei geni coinvolti nella patologia: quattro di questi codificano le maggiori proteine del desmosoma, fatto che indica che la displasia ventricolare aritmogenica destra possa essere una patologia dell'adesione cellulare (Thiene et al. 2007).

La cardiomiopatia restrittiva è caratterizzata da uno sbilanciato riempimento diastolico del ventricolo sinistro, con una fase iniziale di riempimento rapido e una tardiva, più lenta (Fatkin and Graham 2002). E' la patologia più rara tra le cardiomiopatie, ed è causata da condizioni patologiche che irrigidiscono il miocardio per fibrosi o infiltrazione, come la malattia di Fabry, la amiloidosi, lo sclerodermia, la sarcoidosi. Questi processi patologici possono essere confinati al miocardio o interessare anche altri organi. Non sono riportati studi di linkage genetico, al momento è stata individuata solo una mutazione correlata, a livello del gene codificante la desmina (Thiene et al. 2007).

## MODELLI SPERIMENTALI DI CARDIOMIOPATIA: CRICETI UMX7.1 E TO2

L'identificazione di mutazioni coinvolte nella patogenesi delle cardiomiopatie ha portato in un primo momento ad ipotizzare che una specifica via di segnalazione potesse determinare il fenotipo di un determinato tipo di cardiomiopatia; successivamente si è compreso che il fenotipo di una specifica cardiomiopatia è piuttosto la risultante di diversi fattori, genetici, fisiologici, molecolari.

Modelli sperimentali che si sono rivelati estremamente utili per lo studio di cardiomiopatie sono costituiti dai criceti Syrian  $\delta$ -sarcoglicano-deficienti (UMX7.1 e TO2) che sviluppano spontaneamente cardiomiopatia poiché portatori di una delezione a livello della regione del promotore e del primo esone del gene che codifica il  $\delta$ -sarcoglicano (Nigro et al. 1997). Il criceto UMX7.1 sviluppa cardiomiopatia ipertrofica, mentre il criceto TO2 sviluppa cardiomiopatia dilatativa.

I sarcoglicani fanno parte del complesso delle glicoproteine transmembrana associate alla distrofina; insieme a distrofina, sintrofina, distrobrevina, distroglicani, realizzano una connessione tra matrice extracellulare e citoscheletro. L'integrità del complesso è fondamentale per la funzione delle cellule muscolari lisce e un'alterazione del complesso causata da mutazioni a livello della distrofina o di una delle subunità dei sarcoglicani, provoca instabilità del sarcolemma e rende le fibre muscolari più suscettibili al danno cellulare e a morte da necrosi.

I criceti  $\delta$ -sarcoglicano deficienti esibiscono alterazioni diffuse a livello delle giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare, e tali alterazioni attivano meccanismi intracellulari aberranti che contribuiscono al danneggiamento dei cardiomiociti (Masuelli et al.

2003). Il sistema caderina/catenina risulta alterato poiché si assiste alla segregazione della  $\beta$ -catenina a livello dei dischi intercalari; questo implica che il livello della  $\beta$ -catenina nel citoplasma dei cardiomiociti sia basso e insufficiente a trasportare al nucleo il segnale responsabile della attivazione di trascrizione di specifici geni. Questa alterazione del segnale probabilmente contribuisce alla insorgenza del fenotipo ipertrofico (Masuelli et al. 2003).

## ACIDI GRASSI $\omega$ -3 E DIETA: EFFETTI ANTINFIAMMATORI E CARDIO-PROTETTIVI

Trenta anni fa uno studio condotto sull'alimentazione di alcune popolazioni di eschimesi suggeriva che l'alto contenuto in acidi grassi  $\omega$ -3 caratteristico di quella particolare dieta, fosse in grado di determinare una minore incidenza di patologie cardiovascolari (Bang et al. 1976).

Nel corso degli anni, studi epidemiologici, analisi di modelli sperimentali e osservazioni cliniche hanno dimostrato gli effetti benefici che un aumento del contenuto di acidi grassi  $\omega$ -3 nella dieta ha sul sistema cardiovascolare.

L'assunzione di pesce o olio di pesce determina l'apporto nella dieta di acido eicosapentenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA), acidi grassi poliinsaturi  $\omega$ -3, che rimpiazzano gli acidi grassi  $\omega$ -6, soprattutto l'acido arachidonico (AA), a livello delle membrane cellulari, in particolar modo a livello delle membrane di eritrociti, neutrofilo, monociti e cellule epatiche (Simopoulos 2006).

L'AA è il principale substrato per la sintesi degli eicosanoidi, mediatori e regolatori dei processi infiammatori. Gli eicosanoidi, tra cui prostaglandine, trombossani, leucotrieni, acidi grassi idrogenati e lipossine, agiscono nella modulazione della intensità e della durata della risposta infiammatoria, mostrano attività biologica a piccole dosi e, se prodotti in grandi quantità, possono contribuire alla formazione di trombi e ateromi e alla insorgenza di stati allergici e infiammatori (Simopoulos 2006).

Diversi studi hanno dimostrato una forte correlazione tra la quantità di AA in cellule infiammatorie e la capacità di queste cellule di produrre eicosanoidi come PGE2 (Calder 2006).

La quantità di AA nelle cellule infiammatorie può essere incrementata includendo AA nella dieta di ratti (Lewis et al. 1990) o aumentandone l'apporto nella dieta dell'uomo (Wu et al. 2007). La quantità di AA presente nelle cellule infiammatorie può anche essere influenzata dall'apporto nella dieta del suo precursore acido linoleico (Calder 2006).

Il ruolo che AA svolge come precursore della sintesi di eicosanoidi indica l'importanza che l'apporto di AA o acido linolenico nella dieta può avere nella modulazione dei processi infiammatori.

Un aumento di assunzione di EPA e DHA nella dieta risulta in un aumento della produzione di questi acidi grassi tra i fosfolipidi delle cellule infiammatorie. L'incorporazione di EPA e DHA avviene in parte a spese di AA e questo provoca una minore disponibilità di AA per la sintesi di eicosanoidi e quindi una minore produzione di prostaglandina 2, trombossani, LTB4 (Calder 2006).

EPA può anche agire da substrato per alcuni enzimi come la ciclossigenasi e la lipossigenasi che lo convertono in eicosanoidi diversi da quelli generati da AA, con minore attività proinfiammatoria (Whelan et al. 1997; Calder 2006). Per esempio è stato visto che l'assunzione di olio di pesce porta ad un aumento di produzione di LTB5 che risulta 100 volte meno potente come agente chemiotattico per neutrofili rispetto a LTB4 prodotto a partire da AA (Whelan et al. 1997).

Recenti studi hanno identificato un nuovo gruppo di mediatori, chiamati resolvine della serie E, che si generano da EPA per azione di COX2 e che sono dotati di attività anti-infiammatoria (Serhan et al. 2002). Dunque l'effetto antinfiammatorio degli acidi grassi  $\omega$ -3 risiede principalmente nella loro attività di antagonisti del metabolismo di AA.

Sono comunque noti altri effetti antinfiammatori: è stato dimostrato che, se assunti con la dieta in quantità sufficienti, gli acidi grassi  $\omega$ -3 determinano una diminuzione di chemiotassi leucocitaria, una diminuita produzione di radicali liberi e citochine proinfiammatorie, e una diminuzione dell'espressione di molecole di adesione (Calder 2006).

Recenti studi hanno studiato l'effetto protettivo della assunzione di acidi grassi  $\omega$ -3 nei confronti di patologie cardiovascolari; Breslow et al. hanno dimostrato che pazienti reduci da infarto del miocardio, sottoposti ad una dieta ricca di acidi grassi  $\omega$ -3, hanno mostrato una riduzione della mortalità nei due anni successivi, rispetto a gruppi di controllo (Breslow 2006).

Le proprietà cardioprotettive degli acidi grassi  $\omega$ -3 sono state principalmente attribuite agli effetti antiaritmici e antifibrillatori (Pepe and McLennan 2002) e alla loro capacità di alterare la composizione lipidica di membrana e la struttura della membrana plasmatica e quindi di regolare il signaling intracellulare e il metabolismo (Pepe and McLennan 2002).

In modelli sperimentali di cardiomiopatia ereditaria è stato dimostrato che in seguito a somministrazione di acidi grassi  $\omega$ -3, la maggior parte delle proteine transmembrana conservano la loro espressione e localizzazione fisiologiche e anche il signalling intracellulare e l'espressione genica risultano preservate (Fiaccavento et al. 2006).

In vista di ciò, gli effetti antiaritmici e anti infiammatori attribuiti agli acidi grassi  $\omega$ -3 dovrebbero essere considerati la conseguenza della modulazione delle vie del segnale intracellulari esercitata proprio dagli acidi grassi.

E dunque la delucidazione dei meccanismi con cui gli acidi grassi  $\omega$ -3 esercitano il loro ruolo cardioprotettivo è un prerequisito fondamentale

e utile per comprendere come possano essere usati con successo nella prevenzione di patologie cardiache.

## ACIDI GRASSI $\omega$ -3 E CARDIOMIOPATIE

I criceti UMX7.1 esibiscono un anomalo accumulo di acidi grassi  $\omega$ -6 a livello cardiaco e in uno studio recente è stato dimostrato che l'assunzione di una dieta arricchita in ALA è in grado di attenuare il danno miocardico; i cuori di criceti nutriti con dieta arricchita di ALA mostrano un generale recupero delle caratteristiche istologiche tipiche dei cuori sani: struttura ordinata delle miofibrille, recupero della struttura dei mitocondri, riduzione della deposizione di matrice extracellulare fra le fibre con un contenuto di collagene di tipo I inferiore rispetto a quello dei cuori di criceti cardiomiopatici e integrità della membrana plasmatici dei cardiomiociti.

E' stato valutato l'effetto di una dieta arricchita in acido  $\alpha$ -linolenico (ALA) sulla composizione lipidica a livello cardiaco in criceti  $\delta$ -sarcoglicano deficienti (Fiaccavento et al. 2006). ALA è un acido grasso poliinsaturo a 18 atomi di carbonio, contenuto principalmente in olii vegetali come olio di semi di lino e olio di noci (Collomb et al. 2004).

Nei criceti cardiomiopatici nutriti con dieta arricchita di ALA è stato rinvenuto un accumulo di ALA e un aumento del rapporto acido eicosapentanoico/acido arachidonico a livello del miocardio; complessivamente l'apporto di ALA ha determinato un ripristino parziale della funzionalità e della struttura miocardica, e una longevità maggiore nei criceti nutriti con ALA (CMPH/FS) rispetto ai criceti



nutriti con dieta standard (CMPH/ PT): più del 60% dei CMPH/FS risultavano ancora vivi, quando tutti i CMPH/PT erano deceduti (Fiaccavento et al. 2006).

## SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questa ricerca è stato lo studio del rimodellamento dei dischi intercalari in corso di cardiomiopatia ipertrofica e dilatativa ereditaria, utilizzando i modelli sperimentali di criceti cardiomiopatici UMX7.1 e TO2, geneticamente privi del  $\delta$ -sarcoglicano. Sono state inoltre studiate l'espressione e la localizzazione di alcune molecole implicate nell'organizzazione del disco intercalare in corso di cardiomiopatie familiari e secondarie umane.

Considerato, inoltre, il gran numero di studi epidemiologici, sperimentali e clinici che negli ultimi anni hanno dimostrato il ruolo antinfiammatorio e cardioprotettivo degli acidi grassi  $\omega$ -3 assunti con la dieta, in questo studio si è voluto analizzare l'effetto che una dieta arricchita di acidi grassi  $\omega$ -3 ha sul rimodellamento cardiaco in modello sperimentale di criceti UMX7.1.