

RISULTATI I

Allo scopo di analizzare le caratteristiche morfologiche di cuori di criceti cardiomiopatici e confrontarle con cuori sani di controllo, sono stati prelevati a diversi mesi di età cuori di criceti sani e di criceti UMX7.1 e TO2; i ventricoli sono stati fissati in glutaraldeide e inclusi in resina epossidica.

L'analisi ultrastrutturale ha evidenziato una notevole disorganizzazione del tessuto miocardico. Come mostrato in figura 1, nei cuori di criceti UMX7.1 si osserva un'abbondante deposizione di matrice extracellulare tra i cardiomiociti, cospicua angiogenesi e vaste aree di necrosi; a livello dei cardiomiociti si osserva la distruzione del legame cardiomiocita-membrana basale con distacco della membrana basale, dovuto probabilmente all'indebolimento del complesso distrofina- δ -sarcoglicano a causa dell'assenza del δ -sarcoglicano in questo modello animale. I dischi intercalari appaiono aumentati di numero, fortemente disorganizzati, con disposizione caotica e struttura ridondante.

Anche nei cuori di criceti TO2 sono state notate alterazioni a livello del contatto cellula-matrice extracellulare; i dischi intercalari risultano ben organizzati ma è risultata peculiare la presenza di desmosomi e giunzioni comunicanti anche lateralmente alle membrane di cardiomiociti adiacenti, e non esclusivamente a livello dei dischi intercalari (Figura 1).

Poiché l'analisi morfologica ha evidenziato un importante rimodellamento dei dischi intercalari in cuori di criceti cardiomiopatici, si è voluto successivamente analizzare l'espressione delle molecole principalmente coinvolte nella struttura del disco intercalare mediante analisi immunostochimica su sezioni di ventricoli fissate in formalina ed incluse in paraffina, provenienti da tre animali per gruppo di criceti e per gruppo di età. Come mostrato in tabella 1, l'analisi ha mostrato nei cuori di controllo a tre, cinque e sette mesi di vita una moderata espressione di N-caderina, α -

catenina, β -catenina e γ -catenina. I livelli di espressione di N-caderina e β -catenina aumentano fortemente nei cuori di criceti UMX7.1 già a tre mesi di vita e restano alti anche a cinque e sette mesi; nei cuori di criceti TO2, invece, l'espressione non varia rispetto ai cuori di controllo. α -catenina mostra un lieve aumento di espressione nei cuori di criceti UMX7.1 rispetto ai cuori di controllo, e tale aumento permane anche a sette mesi di età. L'espressione nei cuori di criceti TO2, appare invece simile a quella vista nei cuori di controllo. Infine i livelli di espressione di γ -catenina non subiscono variazioni in tutti i casi osservati di criceti UMX7.1 e TO2 rispetto a cuori di controllo (Figura 2).

L'analisi dell'espressione di connessina 43 si è rivelata estremamente interessante poiché ha messo in evidenza che nei cuori di controllo a tre, cinque e sette mesi, la connessina è fortemente espressa e risulta localizzata a livello dei dischi intercalari; nei cuori di criceti UMX7.1 la espressione di connessina 43 è inferiore a quella dei criceti di controllo, mentre in tutti i casi analizzati di cuori di criceti TO2 la connessina appare a livello dei dischi intercalari, ma anche delocalizzata a livello delle superfici laterali dei cardiomiociti e la delocalizzazione, evidente già a tre mesi di età, permane in tutte le fasce di età analizzate (Figura 3). I dati sono riassunti in tabella 2.

Allo scopo di dimostrare se le alterazioni a carico delle molecole responsabili dell'organizzazione dei dischi intercalari evidenziate nei nostri modelli sperimentali di criceti cardiomiopatici, si manifestassero anche in corso di cardiomiopatia umana, sono stati analizzati mediante immunistochemica campioni di tessuto miocardico provenienti da quarantaquattro pazienti sottoposti a trapianto cardiaco affetti dalle seguenti patologie: diciannove pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa idiopatica (DCM); sei pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa genetica nota (DCM); otto pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa secondaria

(CT); undici pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica idiopatica (HCM). Come controllo sono stati utilizzati campioni prelevati da tre cuori di pazienti deceduti per trauma cranico, candidati come donatori per trapianto.

Sono stati quindi analizzati l'espressione e l'organizzazione del complesso caderine-catenine e l'espressione e la localizzazione della connessina 43 mediante immunistochemica, utilizzando anticorpi policlonali specifici per N-caderina, α -, β - e γ -catenina e connessina 43. E' stata inoltre valutata l'intensità di colorazione della marcatura distribuita secondo una scala di gradazione dal negativo (-) al debolmente positivo (+/-), al positivo (+), al fortemente positivo (++ o +++).

I cuori di controllo hanno mostrato una debole positività per N-caderina e β catenina con una localizzazione a livello dei dischi intercalari.

L'espressione di connessina 43 è risultata, invece, intensa ed elevata (Figura 4).

L'analisi immunistochemica ha rilevato un aumento di espressione di N-caderina importante nelle cardiomiopatie dilatative secondarie (75% dei casi analizzati) e meno diffuso negli altri casi (42% delle dilatative idiopatiche, 17% delle dilatative genetiche note, 36% delle ipertrofiche idiopatiche). Più uniforme è l'aumento di espressione di β -catenina nei casi analizzati: l'espressione aumenta nel 63% delle dilatative idiopatiche, nel 50% delle dilatative secondarie e nelle dilatative genetiche note, e nel 55% nelle ipertrofiche idiopatiche. E' interessante notare che un concomitante aumento di N-caderina e β -catenina si ha nel 50% dei casi di dilatative secondarie, ma in percentuale minore negli altri casi analizzati.

L'analisi immunistochemica ha rivelato che l'espressione di connessina 43 è elevata e a livelli comparabili con quelli osservati nei cuori di pazienti di controllo; ma un dato interessante deriva dal fatto che nella maggior parte dei casi analizzati è stata osservata una delocalizzazione di connessina 43 a

livello della superficie laterale dei cardiomiociti. Il fenomeno è diffuso soprattutto nelle dilatative idiopatiche, dove interessa l'89% dei casi analizzati, nelle dilatative genetiche note (66%) e in quelle secondarie (50%), mentre nella cardiomiopatie ipertrofiche idiopatiche è meno diffuso poiché interessa solo il 18% dei casi analizzati (Figura 4, Tabelle 3 e 4).

RISULTATI II

Allo scopo di valutare se ed in che modo una dieta ricca di ALA potesse influenzare il rimodellamento dei dischi intercalari nei criceti cardiomiopatici, in questo studio tre gruppi di criceti sono stati sottoposti a tipi di alimentazione differenti. Criceti Syrian mancanti del δ -sarcoglicano (ceppo UMX7.1) affetti da cardiomiopatia ipertrofica (CMPH) sono stati confrontati con criceti sani Golden Syrian di controllo (GSH). A partire dallo svezzamento, sono stati definiti i tre gruppi di criceti: i criceti CMPH e GSH che sono stati nutriti con dieta standard (PT) e un altro gruppo di criceti CMPH che sono stati invece nutriti con dieta arricchita in ALA (semi di lino, mele e carote; FS). A 150 giorni di età, i criceti sono stati sacrificati e ne sono stati prelevati i ventricoli.

E' stata analizzata l'espressione delle molecole principalmente coinvolte nella organizzazione del disco intercalare mediante western blotting: gli omogenati di 5 cuori per ogni gruppo di criceti sono stati sottoposti ad elettroforesi utilizzando un gradiente di poliacrilamide (4-12%). Le proteine così separate, sono state trasferite su nitrocellulolosa e fatte reagire con gli anticorpi anti N-caderina, anti α -, β -, e γ -catenina. L'intensità del segnale di ibridazione è stata riportata in unità densitometrica dopo normalizzazione con controlli interni, in seguito a scansione della lastra fotografica.

L'analisi ha rivelato un aumento del livello di espressione di N-caderina (174 vs. 119 D.U.; $p=0.0098$), di α -catenina (146 vs. 97 D.U.; $p=0.0012$) e β -catenina (164 vs. 80 D.U.; $p<0.0001$) nei cuori di criceti CMPH/PT rispetto ai cuori di criceti GSH/PT, mentre γ -catenina non mostra differenze nei livelli di espressione tra i due gruppi.

Estremamente interessante si è rivelata l'analisi condotta sui cuori di criceti CMPH/FS poichè ha rivelato una diminuzione importante dei livelli di espressione di N-caderina (174 vs. 127 D.U.; $p=0.019$), di α -catenina (146 vs. 119 D.U.; $p=0.022$) e di β -catenina (164 vs. 96 D.U.; $p=0.0002$) rispetto ai cuori di criceti CMPH/PT (figura 5).

E' stata poi condotta un'analisi mediante immunistoichimica su sezioni di ventricoli fissati in formalina ed inclusi in paraffina, al fine di analizzare la localizzazione delle molecole. L'analisi ha mostrato una notevole diminuzione dei livelli di espressione di N-caderina a livello dei dischi intercalari dei cardiomiociti di cuori di criceti CMPH/FS rispetto ai cuori di criceti CMPH/PT ($p=0.00079$); similmente risultano diminuiti i livelli di espressione di β -catenina e α -catenina ed è interessante notare come la α -catenina mostri livelli del tutto paragonabili a quelli esibiti nei cuori di criceti sani GSH/PT. Complessivamente l'espressione delle molecole analizzate in cuori di criceti CMPH/FS sembra essere molto simile a quella esibita in cuori sani di criceti GSH/PT, e questo supporta quanto visto in western blotting. La γ -catenina non mostra differenze di espressione nei tre gruppi analizzati, come era stato anticipato dall'analisi in western blotting (Figura 6).

Per effettuare l'analisi ultrastrutturale, i ventricoli dei criceti sono stati fissati in glutaraldeide e inclusi in resine epossidiche. L'analisi al microscopio elettronico ha messo in evidenza la organizzazione caotica e disordinata dei cardiomiociti di criceti CMPH/PT: i dischi intercalari appaiono disposti in modo caotico ed è difficile individuarne le componenti

strutturali. Appare invece evidente come la dieta arricchita di ALA riesca a ripristinare, almeno in misura parziale, l'organizzazione ordinata del tessuto miocardico, che mostra all'analisi ultrastrutturale aspetti morfologici molto simili a quelli del tessuto di criceti di controllo (GSH/PT) con miofibre connesse da dischi intercalari caratterizzati da sistemi di giunzione ben riconoscibili (Figura 7).

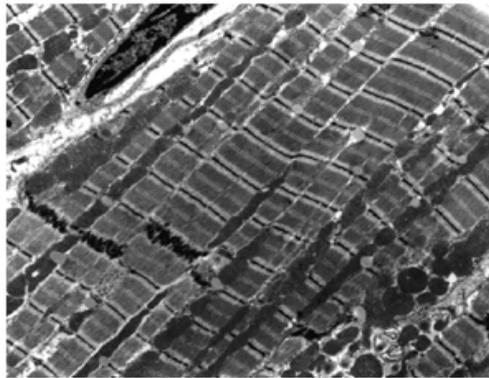
Poiché è noto in letteratura che la dieta arricchita in ALA è in grado di influenzare la composizione in acidi grassi della membrana degli astrociti e di modificare la funzione delle giunzioni comunicanti, è stata condotta l'analisi dell'espressione e localizzazione della connessina 43 a livello dei cardiomiociti ventricolari. Sono stati analizzati gli omogenati di ventricoli di criceti dei tre gruppi mediante western blotting e questa analisi ha rivelato che la espressione di connessina 43 è significativamente inferiore nei criceti CMPH/PT rispetto ai criceti sani, e inoltre che la dieta arricchita di ALA non modifica tali livelli di espressione nei criceti CMPH/FS rispetto ai criceti GSH/PT (Figura 8).

L'analisi della localizzazione di connessina 43 condotta mediante analisi immunohistochimica ha però mostrato che mentre nei cuori di criceti di controllo GSH/PT e nei criceti CMPH/PT la connessina è localizzata pressoché esclusivamente a livello dei dischi intercalari, nei criceti CMPH/FS la connessina risulta delocalizzata a livello delle membrane laterali. Questa localizzazione laterale richiama la distribuzione di connessina 43 osservata in cardiomiociti immaturi di criceti sani (GSH/PT) a 20 giorni di età (Figura 9).

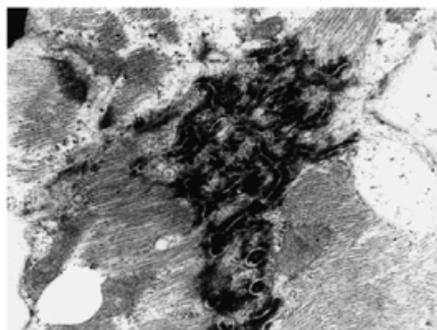
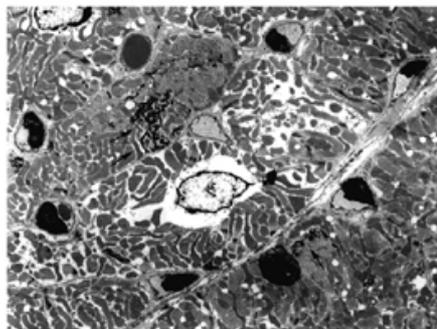
E' stata poi condotta l'analisi ultrastrutturale di sezioni ultrafini di ventricoli per valutare la possibile presenza di giunzioni comunicanti lateralmente a livello delle membrane di cardiomiociti adiacenti. L'osservazione al microscopio elettronico ha confermato quanto visto in immunohistochimica, poiché ha dimostrato la presenza di desmosomi e

giunzioni comunicanti a livello della superficie laterale dei cardiomiociti (Figura 10).

CONTROLLO



**UM-X7
CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA**



**TO2
CARDIOMIOPATIA DILATATIVA**

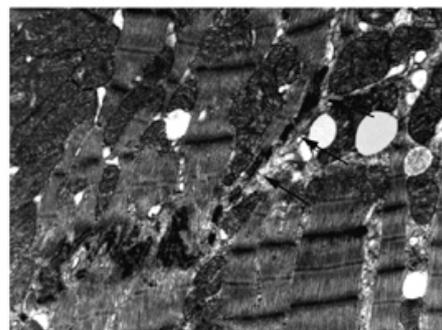
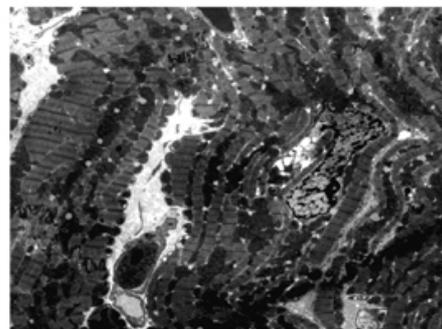


Figura 1: Analisi ultrastrutturale mediante microscopio elettronico a trasmissione dei cuori di criceti di 5 mesi affetti da cardiomiopatia ipertrofica (UM-X7) e dilatativa (TO2) paragonati con cuori di controllo.

Ingrandimenti originali x3500, x1950, x8900.

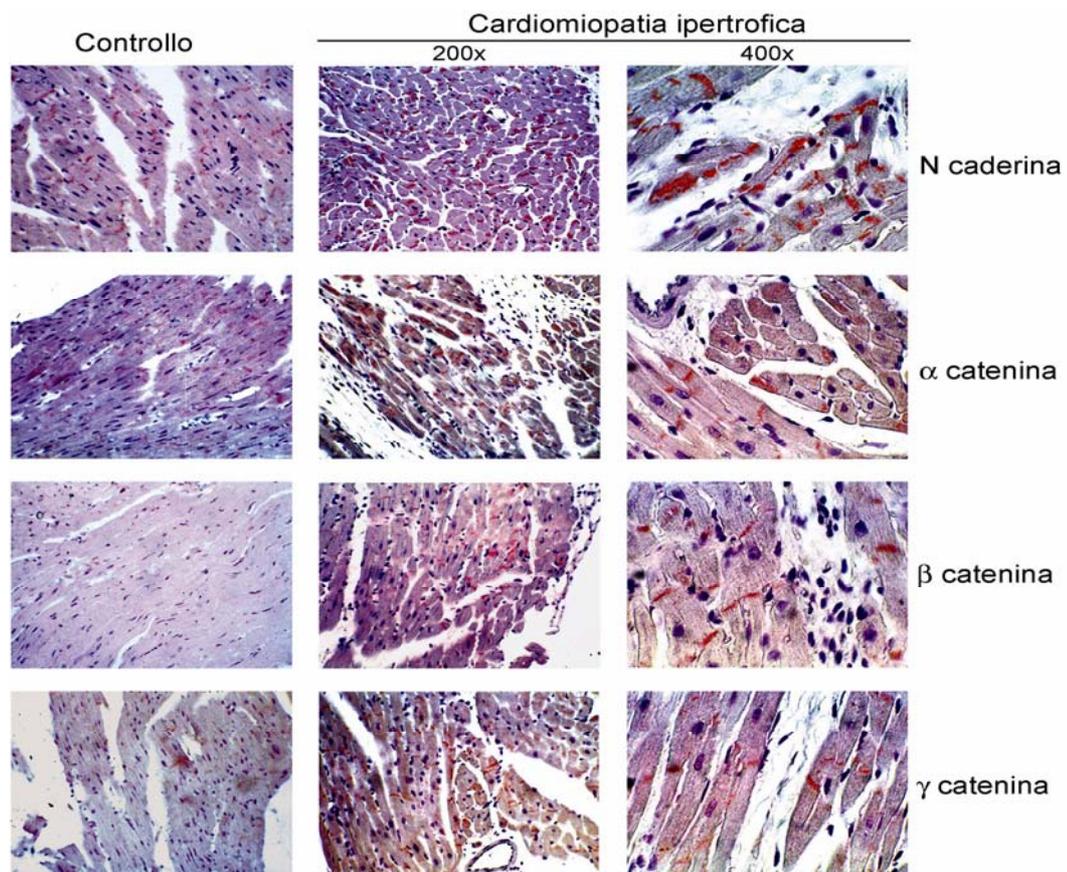


Figura 2: Espressione di N-caderina, α -, β -, γ - catenina in cuori di criceti affetti da cardiomiopatia ipertrofica e in cuori di criceti di controllo.

Analisi immunohistochimica mediante immunoperossidasi su sezioni fissate in formalina e incluse in paraffina (200X e 400X). Cromogeno AEC. Sezioni controcolorate con ematossilina.

	N caderina	α catenina	β catenina	γ catenina
Controllo 3 mesi (n.3 animali)	+/-	+/-	+/-	+/-
UM-X7 3 mesi (n.3 animali)	++	+	++	+/-
TO2 3 mesi (n.3 animali)	+/-	+/-	+/-	+/-
Controllo 5 mesi (n.3 animali)	+/-	+	+/-	+/-
UM-X7 5 mesi (n.3 animali)	++	+	++	+/-
TO2 5 mesi (n.3 animali)	+/-	+/-	+/-	+/-
Controllo 7 mesi (n.3 animali)	+/-	+/-	+/-	+/-
UM-X7 7 mesi (n.3 animali)	++	+	++	+/-
TO2 7 mesi (n.3 animali)	+/-	+/-	+/-	+/-

Tabella 1: Espressione del complesso caderina/catenina in corso di cardiomiopatia ipertrofica (UM-X7) e cardiomiopatia dilatativa (TO2) nel modello sperimentale di criceti geneticamente mancanti del δ sarcoglicano.

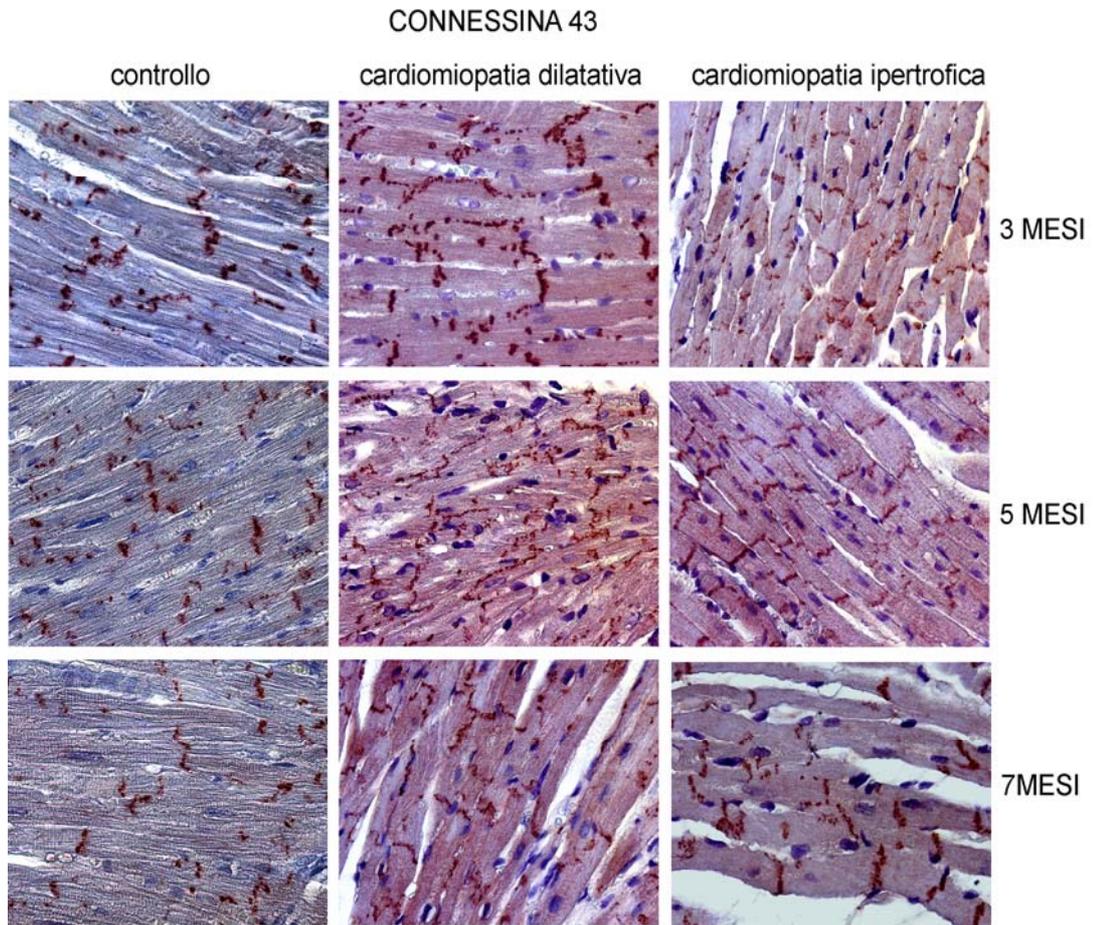


Figura 3: Espressione di connessina 43 in corso di cardiomiopatia dilatativa e cardiomiopatia ipertrofica (criceti TO2 e criceti UM-X7 rispettivamente). Analisi immunohistochimica mediante immunoperossidasi su sezioni fissate in formalina e incluse in paraffina (400X). Cromogeno AEC. Sezioni controcolorate con ematossilina.

	Connessina 43
Controllo 3 mesi (n.3 animali)	+++ (ID)*
UM-X7 3 mesi (n.3 animali)	+ (ID)
TO2 3 mesi (n.3 animali)	+ (ID e laterale)
Controllo 5 mesi (n.3 animali)	+++ (ID)
UM-X7 5 mesi (n.3 animali)	+ (ID)
TO2 5 mesi (n.3 animali)	+ (ID e laterale)
Controllo 7 mesi (n.3 animali)	+++ (ID)
UM-X7 7 mesi (n.3 animali)	+ (ID)
TO2 7 mesi (n.3 animali)	+ (ID e laterale)

Tabella 2: Espressione e localizzazione della connessina 43 in corso di cardiomiopatia ipertrofica (UM-X7) e cardiomiopatia dilatativa (TO2) nel modello sperimentale di criceti geneticamente mancanti del δ -sarcoglicano.

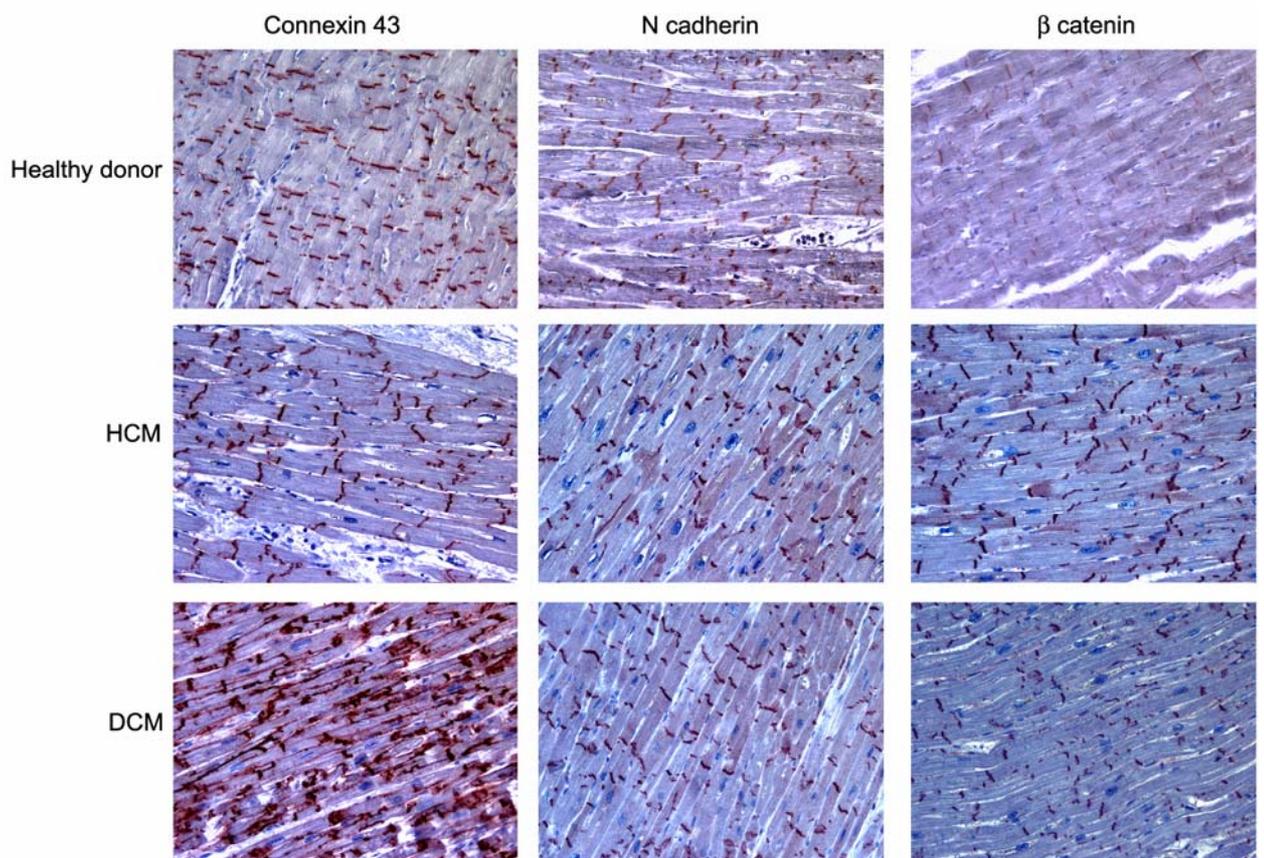


Figura 4: Espressione di connessina 43, N-caderina e β -catenina in cuori sani e di pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica (HCM) e dilatativa (DCM).

Analisi immunoistochimica mediante immunoperossidasi su sezioni fissate in formalina e incluse in paraffina (400X). Cromogeno AEC. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina.

DIAGNOSI	CONNESSINA 43	N-CADERINA	B-CATENINA
CONTROLLO (CT ABORT)	+++	+	+
CONTROLLO (CT ABORT2A)	++/+++	+	+
CONTROLLO (CTAB6)	++	+	+
DCM CONGENITA (153097)	+++	+	++ ▲
DCM CONGENITA (9028)	++	+	++ ▲
DCM CONGENITA (12502)	+++ LAT.	+	+
DCM CONGENITA (16679)	+++ LAT.	+	++ ▲
DCM IDIOMATICA (CT 168)	++/+++ LAT.	++ ▲	+
DCM IDIOMATICA (CT 182)	+++ LAT.	++/+++ ▲	++ ▲
DCM IDIOPATICA (CT 177)	++ LAT.	++ ▲	++ ▲
DCM IDIOMATICA (CT 154)	++ LAT.	++ ▲	+
DCM IDIOPATICA (10924)	+++ disorganizzati/LAT	+	++/+++ ▲
DCM IDIOPATICA (3250)	+++ LAT.	+	++ ▲
DCM IDIOPATICA (7353)	++/+++ LAT.	+	++ ▲
DCM IDIOPATICA (17689)	+++ LAT.	++ ▲	++/+++ ▲
DCM IDIOPATICA (6392)	+++ disorganizzati/LAT	++/+++ ▲	++ ▲
DCM IDIOPATICA (07449)	+++ disorganizzati/LAT	+	+
DCM IDIOPATICA (10407)	++ LAT.	+	+
DCM IDIOPATICA (11800)	+++ LAT.	++/+++ ▲	++/+++ ▲
DCM IDIOPATICA (14466)	++ LAT.	+	+
DCM IDIOPATICA (12112)	++ disorganizzati/LAT	++ ▲	+
DCM IDIOPATICA (15957)	+++ LAT.	+	++ ▲
DCM GEN (13843)	+++ LAT.	+	+
DCM GEN (12093)	+++	+	+
DCM BECKER (11478)	+++ LAT.	+	+
DCM EMERY DREYFUS (02.248)	++/+++ disorganizzati/LAT	+	++ ▲
DCM DUCHENNE (2328)	+++	++ ▲	++ ▲
DCM DISTROFINOPATIA (3277)	++ disorganizzati/LAT	+	++ ▲
HCM IDIOMATICA (CT 100)	++/+++ LAT.	+	+
HCM IDIOPATICA (CT 104)	+ ▼	+	+
HCM IDIOPATICA (5391)	++	++/+++ ▲	+++ ▲
HCM IDIOPATICA (8294)	++	++/+++ ▲	+++ ▲
HCM IDIOPATICA (8740)	++	+	+
HCM IDIOPATICA (174281)	+++ LAT.	+++ ▲	++/+++ ▲
HCM IDIOPATICA (10005)	+++	+	++ ▲
HCM IDIOPATICA (4686)	+ ▼	+	++/+++ ▲
HCM IDIOPATICA (5481)	+++	++ ▲	++ ▲
HCM IDIOPATICA (5370)	+ ▼	+	+
HCM IDIOPATICA (16515)	++/+++	+	+
CT 178 (secondaria PI)	+ ▼	+	+
CT 167 (secondaria PI)	++	+	+
CT 184 (secondaria PI)	++/+++ LAT.	++ ▲	+
CT 152 (secondaria PI)	+++	++ ▲	+++ ▲
CT 153 (secondaria PI)	++ LAT.	++ ▲	+
CT 155 (secondaria PI)	++	++ ▲	++ ▲
18303 (secondaria PM)	+++ LAT.	++/+++ ▲	++ ▲
17949 (secondaria PM)	+++ LAT.	++ ▲	++ ▲

Tabella 4: Espressione di connessina 43, N-caderina e β -catenina nei cuori di donatori sani e di pazienti cardiomiopatici sottoposti ad analisi immunohistochemica.

DIAGNOSI (TOT. CASI 57)	CONNESSINA-43	N-CADERINA	BETA-CATENINA	N-CAD/B-CAT
CUORI DI CONTROLLO (TOT.3)	0/3	0/3	0/3	0/3
DILATATIVE IDIOPATICHE (TOT.19)	17/19 (89%)	8/19 (42%)	12/19 (63%)	5/19 (26%)
DILATATIVE SECONDARIE (TOT. 8)	4/8 (50%)	6/8 (75%)	4/8 (50%)	4/8 (50%)
DILATATIVE GENETICHE NOTE (TOT.6)	4/6 (66%)	1/6 (17%)	3/6 (50%)	1/6 (17%)
IPERTROFICHE IDIOPATICHE (TOT.11)	2/11 (18%)	4/11 (36%)	6/11 (55%)	4/11 (36%)

Tabella 5: Analisi dell'espressione connessina 43, N-caderina e β -catenina nei cuori di donatori sani e di pazienti cardiomiopatici sottoposti ad analisi immunoistochimica.

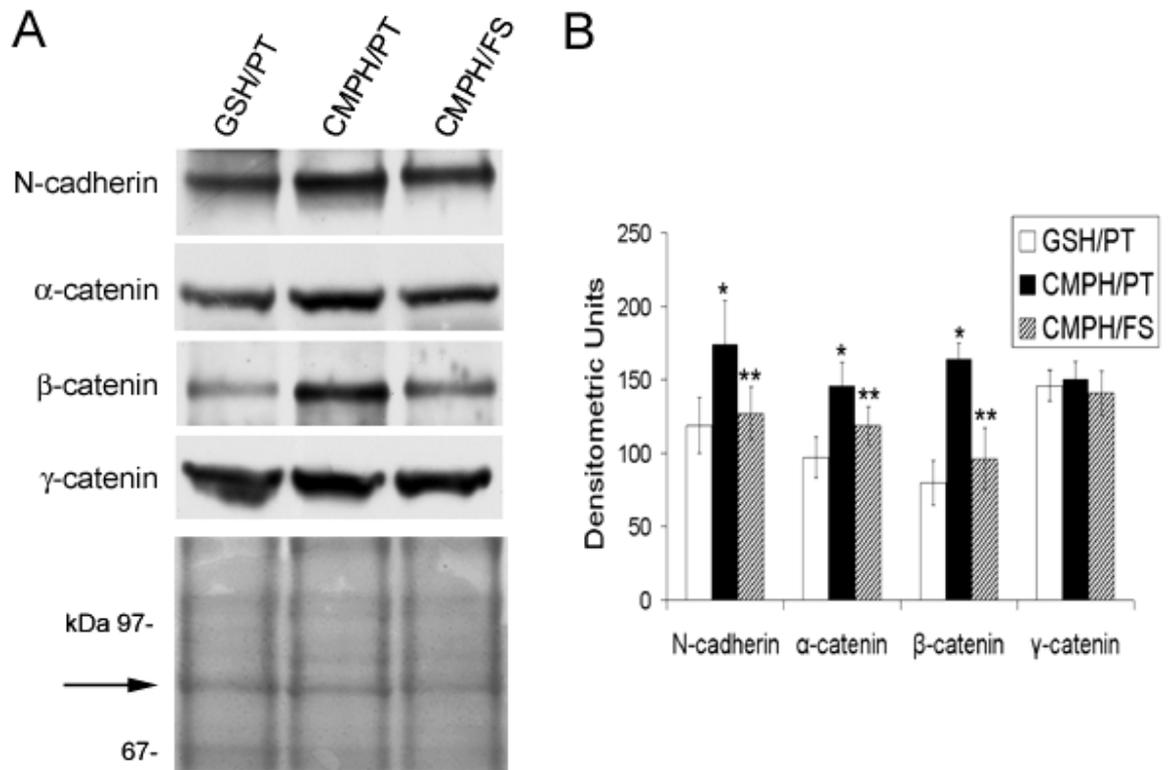


Figura 5: A: Analisi mediante western blotting delle molecole del complesso caderina-catenine su cuori di criceti cardiomiopatici nutriti con dieta standard (GSH/PTe CMPH/PT) e con dieta arricchita di ALA (CMPH/FS).

La freccia indica la espressione della proteina codificata da un gene housekeeping, usata come controllo interno.

B: Analisi densitometrica degli immunoprecipitati delle molecole del complesso caderina-catenina. La normalizzazione dei valori di densitometria è stata eseguita usando il controllo interno indicato in A.

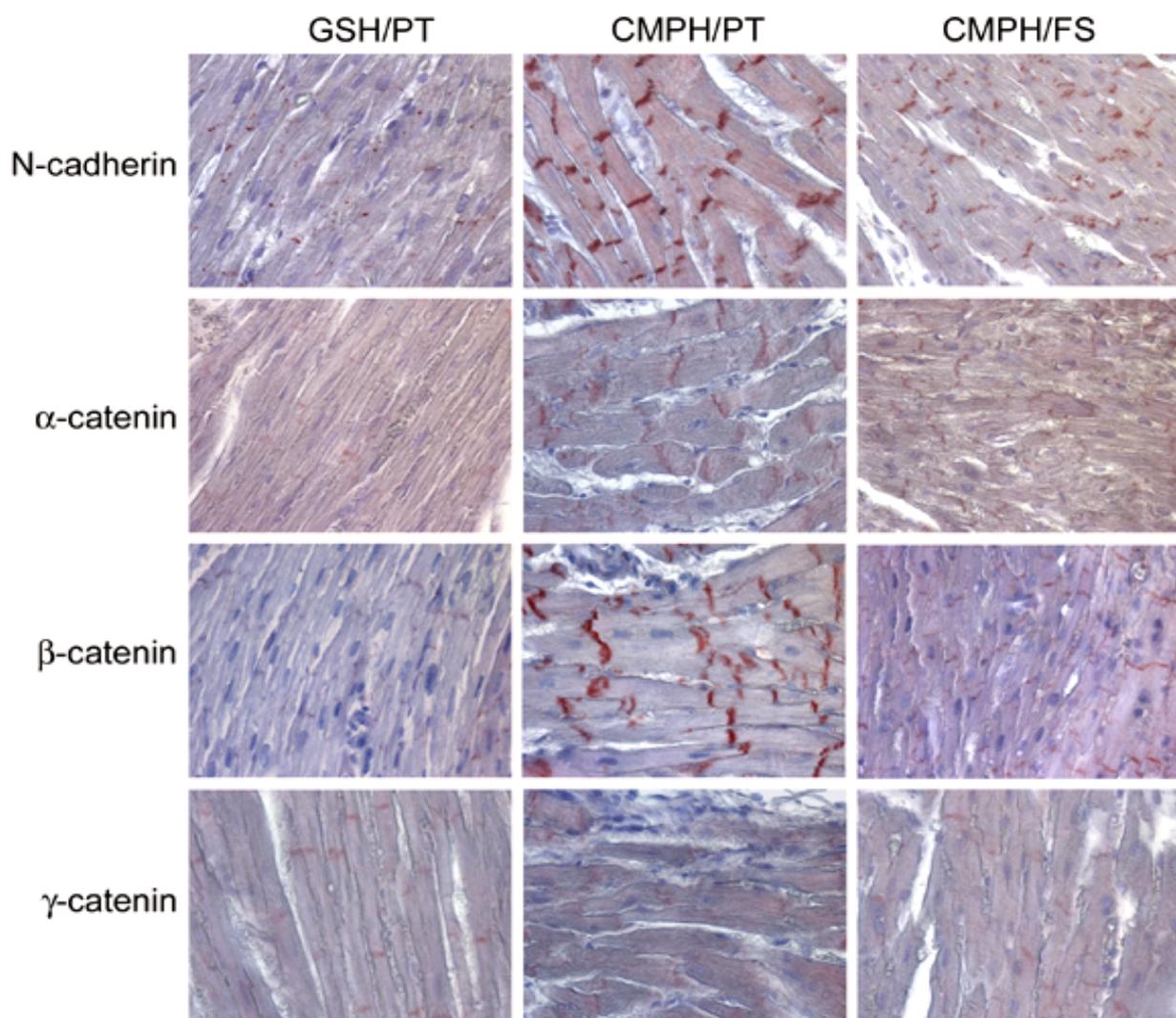


Figura 6: Espressione di N-caderina, alfa-catenina, beta-catenina e gamma-catenina su cuori di criceti cardiomiopatici nutriti con dieta standard (GSH/PT e CMPH/PT) e con dieta arricchita di ALA (CMPH/FS).

Analisi immunoistochimica mediante immunoperossidasi su sezioni fissate in formalina e incluse in paraffina (400X). Cromogeno AEC. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina

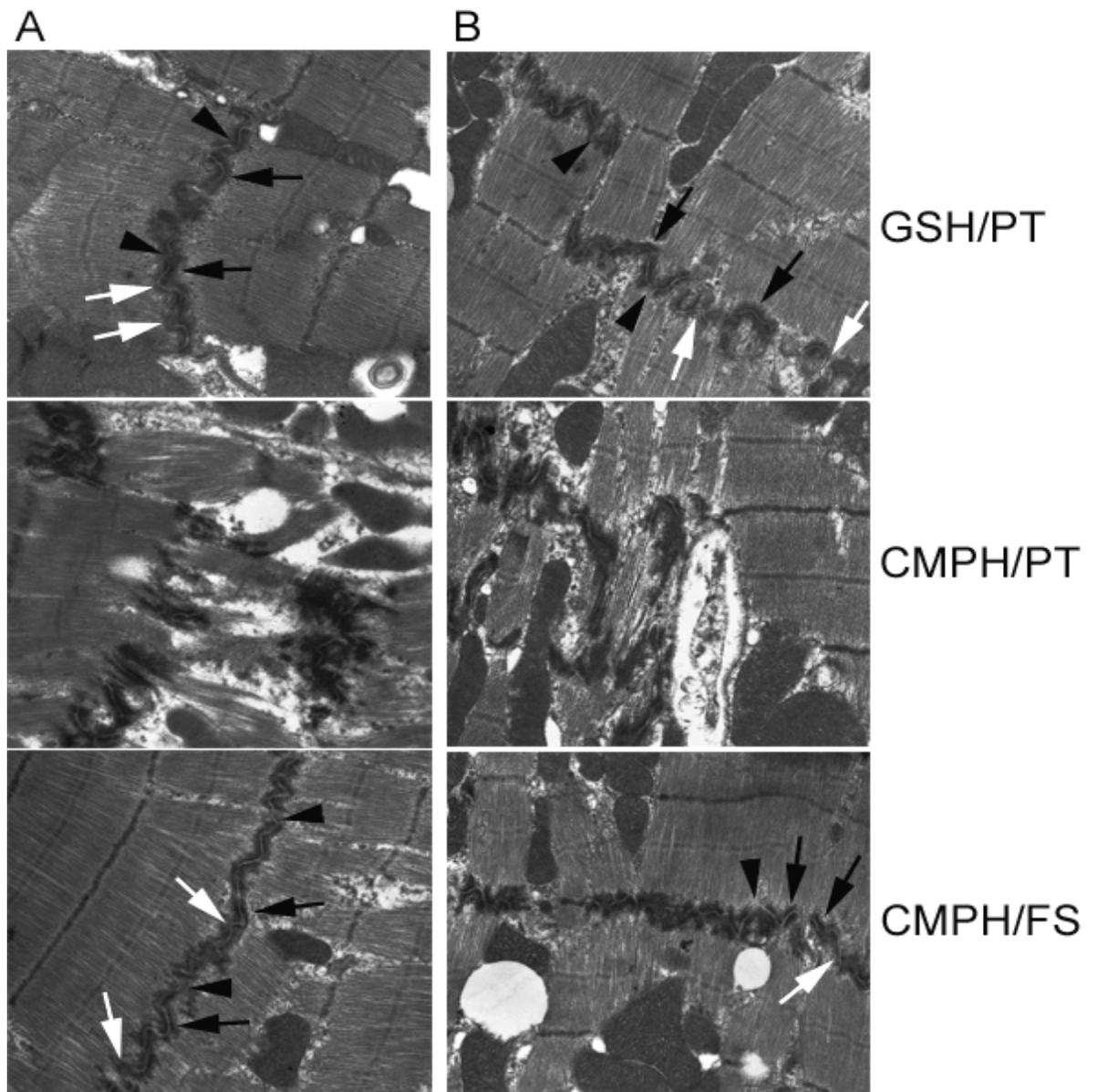


Figura 7: Analisi ultrastrutturale mediante microscopio elettronico a trasmissione dei dischi intercalari in cuori di criceti cardiomiopatici nutriti con dieta standard (GSH/PT e CMPH/PT) e con dieta arricchita di ALA (CMPH/FS).

Ingrandimento

originale:

x15500.

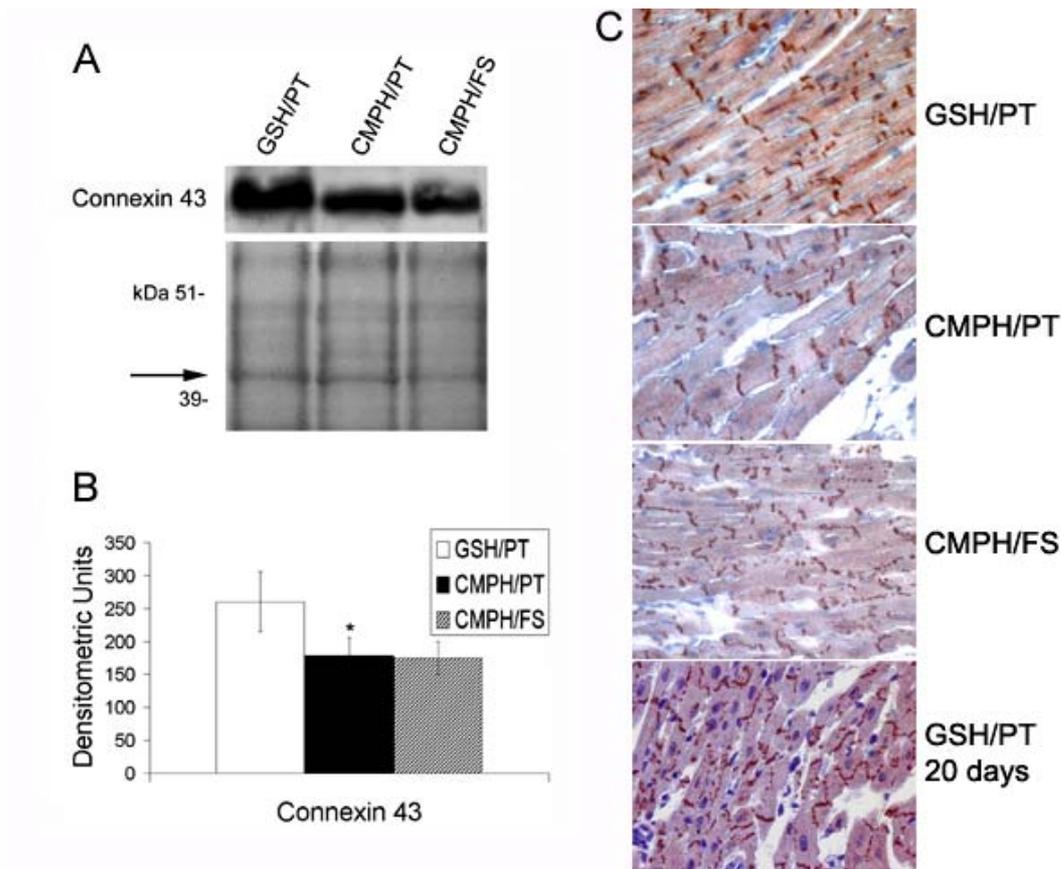


Figura 8: Analisi mediante western blotting di connessina 43 su cuori di criceti cardiomiopatici nutriti con dieta standard (GSH/PTe CMPH/PT) e con dieta arricchita di ALA (CMPH/FS).

La freccia indica la espressione della proteina codificata da un gene housekeeping, usata come controllo interno.

B: Analisi densitometrica degli immunoprecipitati di connessina 43. La normalizzazione dei valori di densitometria è stata eseguita usando il controllo interno indicato in A.

C: Espressione di connessina 43 nei dischi intercalari di cuori di criceti GSH/PT, CMPH/FS di 150 giorni di età e GSH/PT a 20 giorni di vita.

Analisi immunoistochimica mediante immunoperossidasi su sezioni fissate in formalina e incluse in paraffina (400X). Cromogeno AEC. Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina.

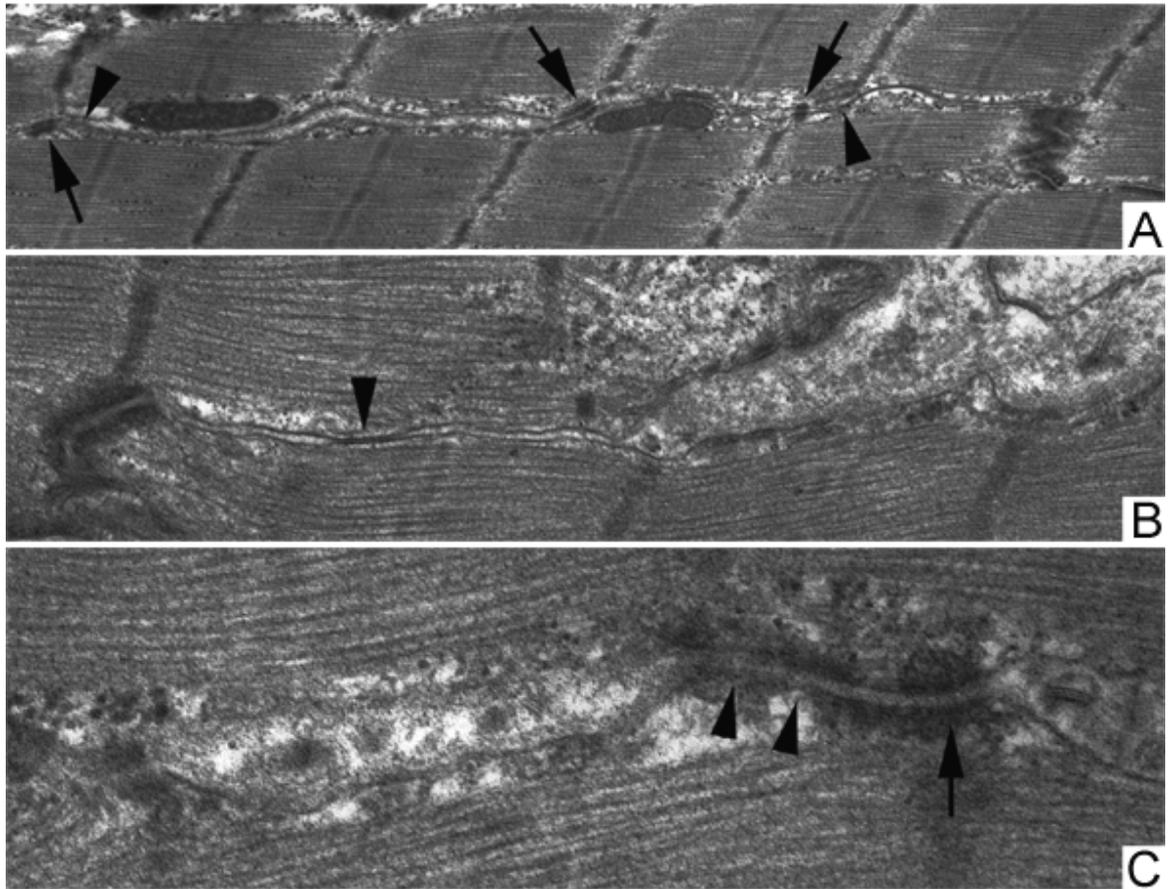


Figura 9: Analisi ultrastrutturale mediante microscopio elettronico a trasmissione dei dischi intercalari in cuori di criceti cardiomiopatici nutriti con dieta arricchita di ALA (CMPH/FS). Gli elementi dei complessi di giunzione sono indicati da frecce complete (desmosomi) o da punte di frecce (giunzioni comunicanti).

Ingrandimenti originali: A: x21000, B: x28500, C: x52000.

