

MATERIALI E METODI

Modello animale e dieta

Sono stati usati criceti CMPH (ceppo UMX7.1), caratterizzati da delezione nel gene codificante il δ -sarcoglicano, e criceti Golden Syrian, allevati nelle stesse condizioni. Sono stati valutati tre differenti gruppi di criceti: CMPH e GSH nutriti con dieta standard (PT) (Rieper, Bolzano, Italia) e CMPH nutriti con dieta arricchita in ALA (semi di lino, mele, carote) (FS). Agli animali è stato concesso mangiare ad libitum, dallo svezzamento alla morte. Ogni 24 ore, il cibo rimanente è stato prelevato e pesato. La quantità totale di cibo consumato da ogni animale non è stata significativamente diversa nei gruppi di criceti sani e cardiomiopatici.

Sono state condotte due analisi nutrizionali indipendenti sulle diete FS e PT dal Laboratorio per il Controllo del cibo dell'Istituto Superiore di Sanità Italiano e da una organizzazione privata (Biodigit srl, Campobasso, Italia). Le analisi hanno mostrato che i nutrienti necessari per il mantenimento di uno stato di buona salute erano in corrette proporzioni in entrambi i regimi nutrizionali. A 100 g di alimenti della dieta PT e FS corrispondevano rispettivamente 222.5 e 202.8 kcal. Inoltre, ogni 7 giorni gli animali venivano pesati, per escludere un possibile dimagrimento attribuibile a regime di restrizione calorica. Negli esperimenti sono stati analizzati cuori provenienti da cinque animali differenti per ogni gruppo analizzato.

I criceti sono stati anestetizzati all'età di 150 giorni con urtano (400 mg/kg i.p.) e sacrificati. I ventricoli escissi sono stati lavati in PBS 1X, pH 7.4, pesati, congelati in azoto liquido e posti a -80° C fino all'uso. Alternativamente, i ventricoli sottoposti all'analisi al microscopio ottico o elettronico sono stati processati come riportato in seguito.

Tutte le procedure sperimentali sono state condotte in accordo con la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" e sono state approvate

dalla Commissione per l'Uso e il Mantenimento di Animali della Università degli Studi di Roma Tor Vergata.

Per lo studio del rimodellamento dei dischi intercalari in corso di cardiomiopatia dilatativa ed ipertrofica sono stati utilizzati criceti UMX7.1, criceti TO2 e criceti Syrian Gold di controllo, sacrificati a 3, 5 e 7 mesi di età. Sono stati analizzati cuori provenienti da cinque animali differenti per ogni gruppo analizzato.

Western blotting

Il western blotting è stato condotto utilizzando gel di poliacrilammide NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen, Italia). Cento μg di estratto cellulare sono stati denaturati mediante bollitura per 10 minuti in buffer di caricamento contenente 15 mM TRIS-HCl pH 6.8, glicerolo (2.5%), SDS (sodio dodecil solfato) (0.5%), Bromofenolo Blu (0,25%) e β -mercaptoetanololo (0.3 M). La miscela proteica è stata separata mediante SDS-PAGE (elettroforesi mediante gel di poliacrilammide). Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) mediante elettroforesi per 1 ora a 40 V. Dopo il trasferimento, i siti di legame non specifici sono stati bloccati mediante incubazione con una soluzione al 5% di latte scremato in polvere (Bio-Rad) in PBS. La membrana è stata poi incubata con gli anticorpi policlonali contro N-caderina, α -, β -, γ - catenina (Santa Cruz, CA, USA) e contro connessina 43 (SIGMA-Aldrich, MI, USA). Dopo lavaggio con PBS contenente lo 0.1% di Tween 20 (PBS-T), la nitrocellulosa è stata incubata con l'anticorpo di capra anti-IgG di topo coniugato con perossidasi di rafano. Il legame antigene-anticorpo è stato visualizzato mediante chemiluminescenza (Supersignal West Pico Chemiluminescence Kit, Pierce, Rockford, IL, USA) dopo aver posto le membrane a contatto con emulsioni fotografiche (Pierce, Rockford, USA). L'intensità delle bande specifiche è stata valutata

usando il software Pro-Image 1.62, dopo scansione della nitrocellulosa con scanner HP scanjet 4890, ed espressa in unità densitometriche dopo normalizzazione con controlli interni di proteine house-keeping.

Immunoperossidasi

I cuori (5 per ogni gruppo studiato) di criceti GSH/PT, CMPH/PT e CMPH/FS di 150 giorni di età sono stati fissati in formaldeide 4% e inclusi in paraffina mediante inclusore automatico. Sono stati analizzati anche cuori di criceti GMPH/PT di 20 giorni di età.

I campioni inclusi sono stati tagliati mediante microtomo per ottenere sezioni di 3-4 μm di spessore da utilizzare per l'analisi immunoistochimica. La paraffina è stata rimossa dalle sezioni mediante incubazione con xilene (10 minuti), e le sezioni sono state reidratate attraverso soluzioni decrescenti di etanolo e lavate in PBS a pH 7.4. L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita tramite incubazione delle sezioni in una soluzione al 3% di H_2O_2 per 10 minuti a temperatura ambiente. L'analisi immunoistochimica è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (UltraTek HRP, Scytek Laboratories, Utah, USA). I siti di legame non specifici sono stati bloccati tramite incubazione con siero non immune di capra per 10 minuti e le sezioni sono state quindi incubate per 1 ora con gli specifici anticorpi policlonali (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le sezioni sono state poi sottoposte a tre lavaggi di 5 minuti in PBS ed incubate con l'anticorpo secondario, per 20 minuti. Dopo aver effettuato tre lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 10 minuti con il coniugato streptavidina-perossidasi e dopo ulteriori lavaggi, la reazione antigene-anticorpo visualizzata tramite il cromogeno AEC (aminoetilcarbazolo). Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina e coperte da un vetrino coprioggetto. Le sezioni sono state osservate e fotografate con microscopio Zeiss Axiophot. L'intensità della reattività è stata valutata indipendentemente da due osservatori è

semiquantitativamente classificata in: -, negativa; ±, debole; + moderata; ++/+++, intensamente positiva.

Analisi ultrastrutturale e istopatologica

Campioni di miocardio sono stati fissati in glutaraldeide 2.5% in PBS pH 7.4; sono stati successivamente incubati in tetrossido di osmio 1.33% e disidratati mediante soluzioni crescenti di etanolo; i campioni sono stati poi incubati in toluolo e in seguito in miscela toluolo-resina epossidica 1:1, infine sono stati incubati in resina epossidica e la resina è stata lasciata a polimerizzare a 60° per 16 ore. Le sezioni sono state ottenute mediante ultramicrotomo e colorate con acetato di uranile e citrato di piombo.

Ogni analisi è stata condotta due volte usando campioni prelevati da tre animali per ogni gruppo di studio.

Analisi statistica

Le associazioni fra le variabili sono state valutate applicando il Fisher's exact test e sono state considerate significative a valori di $p > 0.05$. I valori di densitometria di banda sono stati paragonati usando lo Student's test.