

## Editoriale

# Un nuovo modello organizzativo dell'attività scientifica: il Consorzio Interuniversitario per la Ricerca Cardiovascolare

Claudio Marcello Caldarera

*Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi", Università degli Studi, Bologna*

(Ital Heart J Suppl 2003; 4 (10): 787-793)

© 2003 CEPI Srl

Ricevuto il 9 ottobre 2003; accettato il 17 ottobre 2003.

*Per la corrispondenza:*

Prof. Claudio Marcello Caldarera

*Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" Università degli Studi Via Imerio, 48 40126 Bologna E-mail: caldarer@biocfarm.unibo.it*

Negli ultimi anni le conoscenze in campo cardiovascolare hanno compiuto progressi rilevantissimi, e le problematiche relative allo studio di queste patologie si sono estese ad abbracciare ambiti assai diversi e lontani tra loro, dalla biologia molecolare alle tecnologie dei materiali, richiedendo sempre più uno sforzo di integrazione tra ricercatori di base e clinici. Evidentemente, non è più immaginabile che un unico centro di ricerca possa comprendere in sé tutte queste competenze. Lo strumento di organizzazione consortile, favorito dal recente processo di autonomizzazione degli Atenei, rende ora possibile impostare un soggetto di ricerca che, come una "rete virtuale", favorisca l'integrazione funzionale di vari gruppi tesi ad un comune obiettivo. Viene qui descritta l'esperienza specifica maturata attraverso la creazione del Consorzio Interuniversitario di Ricerca Cardiovascolare (CIRC).

La proposta di istituire il CIRC è emersa dopo approfondite consultazioni avvenute negli anni 1994-1995 fra studiosi e ricercatori di competenze diverse, che sentivano la necessità di coordinare e sviluppare in maniera integrata lo studio dell'apparato cardiovascolare. Questa è stata la prima e vera motivazione che ci ha spinti a dare vita a questa struttura organizzativa consortile prevista dalla legge di riforma dell'Università 382/90, convinti di dare nuovo slancio alla ricerca, raccogliendo giovani e valide sinergie.

La data di nascita del CIRC è quella del 18 ottobre 1996, in cui fu sottoscritto da parte dei Delegati dei Rettori di ben 11 Università italiane l'atto notarile della sua co-

stituzione formale e l'approvazione del relativo Statuto e dei Regolamenti. Nel tempo si sono aggiunte al Consorzio Universitario altre tre sedi, ciascuna con il proprio Delegato a rappresentarla in seno al Consiglio Direttivo (Tab. I).

Questo Consorzio si è organizzato in un momento in cui nel nostro paese, e in tutti i più qualificati centri di ricerca del mondo, si è manifestato un vivo interesse e grande impegno nella ricerca cardiovascolare, paragonabile a una vera e propria rivoluzione copernicana della biologia e della medicina. Le conoscenze della fisiopatologia molecolare dell'apparato cardiovascolare consentiranno di disporre di nuovi e più efficaci mezzi terapeutici per affrontare le gravi patologie del cuore e dei vasi sanguigni.

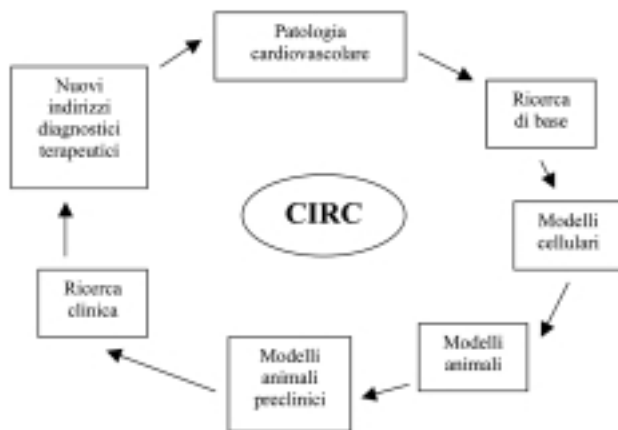
Il primo obiettivo del Consorzio è stato quello di sviluppare e fare crescere in maniera integrata sia la ricerca di "base" sia quella "clinica" in un settore della medicina di grande importanza per la prevenzione e la cura di processi morbosi assai invalidanti che, come noto, costituiscono la principale causa di morte nelle civiltà occidentali (Fig. 1).

Le nuove tecniche di manipolazione genica e l'impiego delle cellule staminali nella riparazione di tessuti lesi, al di là dei risultati fino ad ora raggiunti, lasciano intravedere importanti ricadute a livello clinico che rivoluzioneranno le indicazioni terapeutiche del prossimo futuro.

Il messaggio che nasce dalla nostra iniziativa è che questa istituzione consortile possa essere un centro di propulsione per promuovere, coordinare e valorizzare le competenze e il lavoro delle diverse Unità

**Tabella I.** Il Consiglio Direttivo del Consorzio Interuniversitario per la Ricerca Cardiovascolare.

Sede universitaria	Delegato
Bologna	Prof. Claudio M. Caldarera (Direttore)
Brescia	Prof. Odoardo Visioli
Chieti	Prof. Andrea Mezzetti
Firenze	Prof. Fabrizio Ledda
Milano	Prof. Alberico L. Catapano
Modena	Prof. Giorgio Mattioli
Napoli "Federico II"	Prof. Massimo Chiariello
Parma	Prof. Carlo Clo'
Perugia	Prof. Giuseppe Ambrosio
Pisa	Prof. Mario Mariani
Roma "La Sapienza"	Prof. Nicola Alessandri
Roma "Tor Vergata"	Prof. Renato Lauro
Torino	Prof. Gianni Losano
Verona	Prof. Antonio Cevese



**Figura 1.** Schema per la ricerca di nuove strategie terapeutiche. CIRC = Consorzio Interuniversitario per la Ricerca Cardiovascolare.

Operative che ne fanno parte, favorendo il reperimento di finanziamenti aggiuntivi ed adeguati per la realizzazione dei progetti scientifici e consentire altresì ai ricercatori italiani di poter accedere e partecipare ai progetti strategici programmati dalle Istituzioni e Agenzie internazionali. Ciò implica un notevole sforzo organizzativo e finanziario non compatibile con le risorse attualmente disponibili. Formuliamo l'auspicio che le Autorità politiche e di governo recepiscano il significato e il valore di questa iniziativa, affinché possa contribuire allo sviluppo della ricerca in campo cardiovascolare in maniera coordinata e competitiva.

### Le principali linee di ricerca

Il ruolo principale del CIRC è quello del coordinamento delle singole Unità Operative che vi afferiscono, per consentire il più razionale utilizzo delle risorse e delle attrezzature disponibili, per una più ampia diffusione e condivisione dei risultati raggiunti. Questa atti-

vità di coordinamento, anche se richiede un notevole sforzo organizzativo, può contare sulla notevole esperienza culturale e tecnica dei gruppi di ricerca che hanno aderito al Consorzio. Riassumere le competenze coinvolte e le problematiche che vengono studiate dai gruppi di ricercatori del Consorzio, è un'operazione che rischia di sminuirne il significato culturale e tecnologico. È comunque possibile individuare alcuni indirizzi nei quali si riversano gli interessi e le capacità degli scienziati e dei clinici che afferiscono al CIRC. Gli aspetti metabolici della fisiopatologia cardiovascolare, ad esempio, sono un argomento di grande rilievo, se si pensa alle implicazioni che le disfunzioni nei processi biochimici che regolano il metabolismo del colesterolo, dei trigliceridi e delle lipoproteine hanno nella patogenesi dell'aterosclerosi. Comprendere quali siano i fenomeni chiave nell'evoluzione degli eventi cellulari che sono alla base della malattia aterosclerotica significa individuare nel contempo le strategie farmacologiche per intervenire sulla formazione e sul progresso della lesione aterosclerotica. A questa tematica si lega strettamente lo studio delle interazioni fra il flusso ematico, l'endotelio e la parete dell'albero cardiovascolare. La cognizione che il circuito vascolare rappresentato dai nostri vasi sanguigni è molto più che una semplice rete di condotti, passivamente soggetti al governo di fattori esterni, ci ha dato in tempi recentissimi strumenti per il controllo efficace della patologia ipertensiva e delle gravi conseguenze da essa provocate sia a livello dei letti vascolari periferici sia sulla stessa efficienza dell'attività contrattile cardiaca. Quest'ultima, in particolare, rappresenta un tema centrale nell'insieme degli studi promossi e valorizzati dal CIRC. È ormai chiaro che il bilancio tra i fenomeni di proliferazione e di morte cellulare – sia a livello del tessuto vascolare che a carico dei cardiomiociti – rappresenta un equilibrio critico nei processi di rimodellamento che il miocardio è in grado di attivare in situazioni di sofferenza ischemica (angina, infarto) come pure nel caso di un sovraccarico dinamico, preludio all'ipertrofia. La comprensione dei meccanismi dell'aritmogenesi e la terapia dei disturbi del ritmo cardiaco risente dei progressi garantiti dagli studi elettrofisiologici e dalla modulazione fisiofarmacologica delle proprietà eccito-contrattili dei cardiomiociti. Sono state perfezionate le nuove strategie di protezione del miocardio in ischemia e riperfusione allo scopo di potenziare i meccanismi endogeni di resistenza cellulare attraverso lo studio del metabolismo mitocondriale, della reattività vascolare e della possibilità di preconditionamento. Lo studio della patogenesi, la diagnosi e il trattamento delle cardiomiopatie sono ormai profondamente influenzati dai riflessi dei nuovi approcci culturali e tecnologici sia sul versante della patologia ischemica acuta e cronica, sia sul fronte delle forme dilatative idiopatiche. In questo contesto, più che in ogni altro, sono già verificabili quotidianamente gli enormi passi in avanti che ci sono stati concessi dall'utilizzo degli approcci di biologia molecolare (Fig. 2).

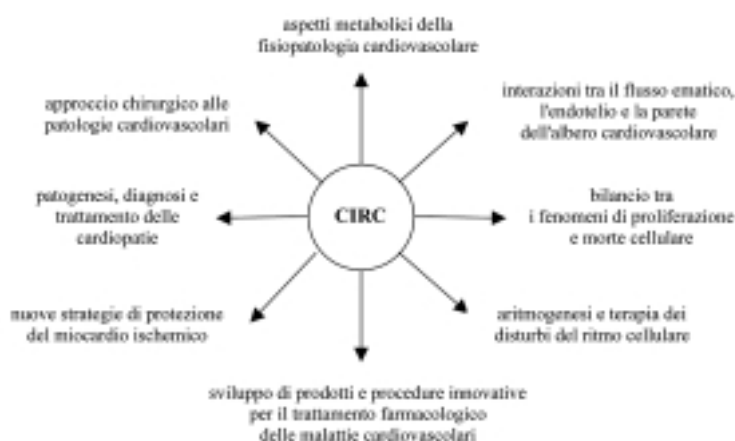


Figura 2. Principali linee di ricerca del Consorzio Interuniversitario per la Ricerca Cardiovascolare (CIRC).

La chirurgia nel trattamento delle patologie cardiovascolari ha sempre rappresentato un riferimento sicuro e continua ad adeguarsi alle esigenze più moderne con l'implantologia vascolare e le nuove prospettive in ambito di trapianto e di strategie alternative come la cardiomioplastica e la cardioplastica. Infine, una nuova e avanzata frontiera riguarda lo studio della genetica molecolare delle patologie cardiovascolari che apre lo spazio alla terapia genica, la grande sfida del secolo appena iniziato. Recenti successi della biologia cellulare hanno indotto alcuni ricercatori a studiare il recupero di tessuti cardiovascolari danneggiati mediante il trapianto di cellule staminali. In questi ultimi anni sono infatti comparsi in letteratura studi e ricerche di rigenerazione del miocardio danneggiato dall'ischemia acuta o da infarto, tramite l'attivazione di cellule multipotenti. Le cellule staminali potrebbero infatti favorire la formazione di nuove cellule cardiache e vascolari in sostituzione del tessuto necrotico, recuperandone l'attività contrattile ed elettrica.

Le ricerche realizzate dalle Unità Operative del CIRC in questi ultimi anni sono state oggetto di oltre 450 articoli pubblicati su riviste specializzate ad elevato fattore di impatto, consentendoci di competere egregiamente con lo scenario scientifico internazionale.

### Ricerche svolte nel quinquennio 1997-2002

**Protezione del miocardio ischemico.** La strategia più efficace nel prevenire il danno ischemico consiste nel sottoporre preventivamente il cuore a brevi cicli di ischemia/riperfusion, condizione che prende il nome di preconditionamento ischemico. I meccanismi di natura endoteliale, efficaci soprattutto nella prevenzione delle aritmie da riperfusion, trovano un ruolo fondamentale nella maggiore produzione di ossido di azoto (NO). A causa della maggiore liberazione di NO il preconditionamento ischemico favorisce anche le modificazioni del flusso coronarico. Nell'ambito degli studi eseguiti dalle Unità Operative si è potuto evidenziare

come il preconditionamento riduca la durata e il flusso totale dell'iperemia reattiva ed aumenti la velocità della vasodilatazione. Il preconditionamento ischemico si è mostrato efficace anche nel ridurre la frequenza di aritmie che seguono un episodio ischemico. Anche in questo caso l'effetto antiaritmico è attribuibile ad un aumentato rilascio di NO da parte dell'endotelio coronarico. I meccanismi mediante i quali il preconditionamento esercita effetti protettivi sul cuore ischemico possono quindi essere attribuibili all'attivazione dei recettori per l'adenosina  $A_1$ , per ciò che riguarda la diminuzione del flusso iperemico totale, mentre il minore tempo al picco del flusso iperemico è dovuto all'aumentato rilascio di NO da parte dell'endotelio. Ciò suggerisce che, oltre al ben noto effetto di protezione nei confronti del tessuto miocardico, il preconditionamento ischemico è in grado di esercitare una sorta di protezione anche a livello dei vasi coronarici.

Altre ricerche sono state intraprese per valutare il ruolo del rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico nella patogenesi del danno da ischemia/riperfusion e nel preconditionamento ischemico. In particolare la modulazione da parte dell'adenosina dei canali del calcio che legano la rianodina, attraverso i recettori di tipo  $A_3$ , suggerisce nuovi meccanismi di protezione indotti dal preconditionamento, nonché nuove strategie di intervento farmacologico.

### Fisiopatologia del cuore ipertrofico e insufficiente.

L'insufficienza cardiaca rappresenta un altro capitolo importante della patologia dell'apparato cardiovascolare. Nelle cellule endoteliali delle coronarie di cuori insufficienti la sintesi di NO è ridotta per una minore espressione genica dell'enzima preposto alla sua formazione di tipo costitutivo (eNOS), mentre l'isoenzima inducibile (iNOS) viene stimolato nei macrofagi, provocando squilibri di tipo funzionale e metabolico. Alcuni studi hanno mostrato come le statine, farmaci attualmente impiegati per ridurre i livelli di colesterolemia, possano svolgere un'azione cardioprotettiva in modelli di ischemia e riperfusion del cuore isolato di

ratto. L'effetto delle statine dipende dalla capacità di preservare la funzione della eNOS. La concentrazione della eNOS nel tessuto miocardico soggetto a ischemia tende infatti a diminuire in funzione della severità del danno, determinando un calo dei livelli cardiaci di NO e di guanosinmonofosfato ciclico (GMPc). Un altro ruolo importante svolto dall'NO nel muscolo cardiaco riguarda la regolazione dei processi bioenergetici mitocondriali, considerato che in questi organelli è stata messa in evidenza l'attività enzimatica della NOS. La somministrazione di un nuovo composto donatore di NO, la dietilenetriamina/NO, accelera la velocità di vasodilatazione tipica dell'iperemia reattiva all'occlusione coronarica, mentre il graduale rilascio dell'anione nitrosilico riduce marcatamente l'estensione dell'area di infarto.

Altri studi hanno dimostrato che è possibile contrastare la superinduzione della iNOS nelle fasi più tardive della riperfusione postischemica mediante uso di statine o di polifenoli estratti dal tè verde. In particolare, l'azione del polifenolo epigallocatechina gallato sembra essere riconducibile all'inibizione del fattore di trascrizione STAT1, intercalato nella via di trasduzione del segnale indotto dall'interferone- $\gamma$ .

La morte improvvisa causata da aritmie ventricolari fatali è uno dei fattori di rischio più importanti nei pazienti con ipertrofia ed insufficienza cardiaca. Recenti risultati hanno dimostrato che le alterazioni elettrofisiologiche cellulari possono contribuire all'aritmogenesi dell'insufficienza cardiaca. Nelle cellule ventricolari di pazienti con insufficienza cardiaca terminale è stata dimostrata la presenza di una corrente tipica dei miociti dei centri pacemaker cardiaci primari e secondari, la corrente associata all'attivazione del canale *f*. La presenza della corrente pacemaker *I<sub>f</sub>* nei miociti ventricolari umani può rappresentare un nuovo, importante meccanismo aritmogeno e un bersaglio farmacologico nelle cardiomiopatie.

**Nuovi fattori di rischio per le malattie cardiovascolari.** Un tema sempre più in espansione è quello inerente ai nuovi fattori di rischio di malattia coronarica e cardiovascolare, poiché consente di allargare il livello di prevenzione in fasce di popolazione precedentemente non considerate. Molta attenzione è stata rivolta all'iperomocisteinemia, un'alterazione metabolica della metionina ad etiologia multifattoriale, ereditaria ed acquisita. Studi eseguiti in soggetti appartenenti a stesse famiglie evidenziavano che l'aggregazione familiare, che influenza sia lo scambio del patrimonio genetico che dell'ambiente socio-culturale e delle abitudini alimentari, può indurre un rischio differente di omocisteinemia. In particolare lo studio di mutazioni genetiche codificanti enzimi chiave del metabolismo dell'omocisteina (metilene tetraidrofolato reductasi, cistationina  $\beta$ -sintetasi) ha consentito di valutare l'influenza relativa dei fattori genetici su quelli alimentari nello sviluppo dell'iperomocisteinemia.

Un altro fattore fortemente associato al rischio di infarto miocardico è il C3 sierico che è correlato ai principali fattori di rischio metabolici (colesterolo, trigliceridi, glicemia, insulina), con l'indice di massa corporea e con la pressione arteriosa. Ciò potrebbe rispecchiare il fondamentale ruolo regolatore del metabolismo del tessuto adiposo esplicito dall'*acylation stimulating protein*, che coincide con il C3a-des-Arg, di cui il C3 è precursore. Peraltro il C3 è anche una proteina della fase acuta, che potrebbe essere influenzata dai processi infiammatori che caratterizzano le placche aterosclerotiche vulnerabili ed è più elevato nei soggetti con placche carotidee ecograficamente "soft". Queste placche contengono grandi quantità di macrofagi, produttori diretti o indiretti di C3, attivati dalle lipoproteine a bassa densità ossidate.

**Prevenzione primaria dell'aterosclerosi e delle complicazioni trombotiche.** Sul piano preventivo è stata ulteriormente messa in evidenza l'efficacia della dieta mediterranea nel limitare l'insorgenza di lesioni aterosclerotiche. L'acido oleico, in concentrazioni nutrizionalmente rilevanti, riduce l'attivazione endoteliale indotta da citochine, diminuendo l'espressione delle molecole di adesione per i leucociti tramite modulazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B.

Sono stati svolti degli studi anche sull'evoluzione dell'aterosclerosi in condizioni di sofferenza tissutale da ipossia e ischemia. Le cellule muscolari lisce vascolari, sottoposte a severa ipossia, mostrano una variazione fenotipica che le rende capaci di rispondere, in termini di proliferazione e variazione delle proprietà contrattili, ad un fattore di crescita quale quello endoteliale vascolare, che è stato considerato fino ad oggi un agente mitogeno dotato di esclusiva specificità d'azione a livello delle cellule endoteliali. I risultati dimostrano quindi che il fattore di crescita endoteliale vascolare può, in condizioni di sofferenza patologica, esplicare effetti "rimodellanti" non solo sulle cellule endoteliali ma anche a carico della componente muscolare liscia vascolare.

La rilevazione nell'uomo dell'aterosclerosi complicata da trombosi, mediante scintigrafia con piastrine radiomarcate (indio-111), ha mostrato non solo un elevato livello di sensibilità della tecnica, ma anche di accuratezza in quanto veniva sottratta la componente ematica circolante. Lo studio dimostra la possibilità di individuare lesioni arteriose complicate da trombosi anche quando esse non determinano gradi rilevanti di stenosi. Tra i fattori che naturalmente si oppongono al fenomeno trombotico, l'NO è sicuramente tra i più efficaci in quanto esercita una potente azione antiaggregante. Sono stati approfonditi studi sull'interazione tra NO e attivazione piastrinica mediante impiego di un nuovo farmaco liberatore di NO (NCX4016). Di quest'ultimo si è documentata l'attività di inibizione sulla biosintesi del trombossano e sull'espressione del fattore tissutale da parte di monociti umani.

**Influenza ormonale sulla funzionalità cardiovascolare.** Piccole variazioni delle concentrazioni dell'ormone tiroideo, come quelle riscontrate nelle condizioni di ipertiroidismo ed ipotiroidismo subclinico, determinano importanti effetti sull'apparato cardiovascolare, causando modificazioni morfologiche e funzionali del cuore. Queste evidenze inducono a rivedere le indicazioni terapeutiche per le disfunzioni subcliniche della tiroide. Altri studi sugli effetti della somministrazione dell'ormone della crescita nella terapia dell'insufficienza cardiaca cronica da cardiomiopia dilatativa sono stati intrapresi per comprendere il meccanismo d'azione di questo ormone in tale patologia. I risultati ottenuti sono incoraggianti in quanto mostrano che il trattamento con ormone della crescita corregge la disfunzione endoteliale nei pazienti con insufficienza cardiaca cronica. L'azione esercitata sul muscolo cardiaco dal composto hexarelin, un peptide sintetico capace di indurre *in vivo* il rilascio di ormone della crescita, nonché di esercitare un effetto protettivo nel miocardio ischemico ripperfuso, risulta invece indipendente dall'ormone della crescita. Hexarelin promuove inoltre la sintesi di prostaciclina, esercitando un effetto protettivo sul muscolo papillare reso anossico e poi riossigenato. Queste ricerche stanno proseguendo con lo studio degli effetti di ghrelin, un ormone della crescita secretagogo endogeno, recentemente isolato dallo stomaco.

**Nuove strategie di intervento in cardiocirurgia.** La fibrillazione atriale è la causa principale di stroke di origine cardiaca. La sinusalizzazione di un paziente affetto da valvulopatia mitralica permette di ridurre in modo significativo tale rischio, migliorando nel contempo la performance emodinamica. Attualmente è in corso un trial per sperimentare le nuove metodiche tecnologiche quali radiofrequenza e microne, permettendo di estendere tale approccio anche ai grandi anziani. Molti pazienti chiedono sempre più frequentemente di essere operati con una chirurgia poco invasiva, specialmente per motivi di riabilitazione, di cosmesi e di comfort. Mediante chirurgia attraverso "port-access" (piccola incisione) il cuore viene arrestato con un clamp endoaortico presente in un catetere introdotto attraverso l'arteria femorale. Con questa tecnica sono stati eseguiti interventi di riparazione e sostituzione della valvola mitrale e tricuspide e di alcune cardiopatie congenite, quali il difetto interatriale, il ritorno venoso anormale parziale ed i tumori del cuore. È stata inoltre introdotta la tecnica della rivascolarizzazione miocardica a cuore battente, eseguendo interventi sia ai condotti venosi che arteriosi.

Nell'ambito dei trapianti cardiaci sono stati eseguiti trapianti combinati cuore e fegato come trattamento radicale di una forma specifica di amiloidosi, la polineuropatia ereditaria familiare. Questa malattia è caratterizzata da una mutazione della proteina "transtiretina", relativamente all'aminoacido Glu89. Dal Registro Mondiale risulta che sono stati eseguiti solo tre trapianti com-

binati cuore-fegato nella polineuropatia familiare. L'ipotesi di questo approccio terapeutico è che si dovrebbe ottenere la guarigione, contrariamente a quello che avviene con il trapianto del solo cuore o del solo fegato.

### Progetti attualmente finanziati dal Consorzio

**Studio dei processi di differenziamento delle cellule staminali verso linee cardiovascolari.** L'aspetto più importante che caratterizza il recupero funzionale del tessuto cardiaco dopo infarto è quello che sia evitata la distruzione di cellule vitali nell'area ischemica, particolarmente nella fase di riperfusione coronarica, salvaguardandone l'attività elettrica e metabolica. I recenti successi compiuti nel campo della biologia cellulare che hanno portato in alcuni campi della patologia cerebrale ed emopoietica ad ottenere nell'attivazione di cellule staminali residenti o circolanti il recupero di tessuti o cellule danneggiate, ha indotto alcuni ricercatori a proporre la stessa strategia nel campo cardiovascolare. In questi ultimi anni sono infatti comparsi in letteratura studi di rigenerazione di tessuto cardiaco danneggiato da infarto, sia in animali da laboratorio che in pazienti. I risultati di questi studi sono di considerevole interesse perché aprono una nuova prospettiva di terapia e cioè favorire la formazione di nuove cellule cardiache e vascolari in sostituzione del tessuto necrotico.

Cellule staminali di origine mesenchimale (MSC) saranno separate dal midollo osseo umano e di ratto. Le cellule del midollo verranno seminate su un terreno di coltura, per circa 1 mese, al fine di selezionare le MSC (aderenti) dai precursori emopoietici. La definitiva caratterizzazione delle MSC sarà effettuata separando la popolazione cellulare positiva a CD90 e CD59 e negativa a CD34 e CD45. Le MSC saranno coltivate in presenza di fattori potenzialmente in grado di aumentarne la velocità di replicazione *in vitro*. Saranno inoltre studiate le vie di trasduzione del segnale intracellulare che ne regolano l'espressione, con particolare riguardo alle proteine chinasi-dipendenti dai nucleotidi ciclici ed alle MAPK (proteinchinasi attivata da mitogeni). Parallelamente alla stimolazione della proliferazione delle MSC, si cercherà di inibire il processo di apoptosi cellulare, aumentando quindi ulteriormente le potenzialità replicative delle cellule in coltura. Saranno studiate sia la via recettoriale che quella mitocondriale di induzione dell'apoptosi, mediante valutazione dell'attività caspasi e dell'espressione delle proteine della famiglia bcl-2. Si procederà quindi all'arricchimento del terreno di coltura con appropriati fattori antiapoptotici (ad esempio inibitori delle caspasi e della transizione di permeabilità mitocondriale) o che influiscono sulla vitalità cellulare (ad esempio modulatori di proteinchinasi e fosfatasi). Lo studio dei meccanismi molecolari che favoriscono il differenziamento delle MSC in cardiomioblasti sarà sviluppato esponendo le MSC a condizioni ipossiche (5% O<sub>2</sub>), oppure trattandole con alcuni fattori di crescita che verosimilmente mo-

dulano i processi di differenziamento dei cardiomiociti (*cardiotrophin-1*, *insulin-like growth factor I*, *bone morphogenetic proteins*), in presenza o assenza di 5-azacitidina. L'avvenuta trasformazione delle MSC sarà confermata mettendo in evidenza i trascritti dei geni GATA-4, NKx2.5/Csx, MEF-2, peptide natriuretico atriale, normalmente presenti durante lo sviluppo embrionale e fetale cardiaco. Altri marker riguarderanno specifiche proteine del miocardio (catene pesanti  $\alpha$  della miosina, catene leggere della miosina ventricolare, troponina I cardiaca, connessina 43). Il grado di differenziamento sarà inoltre determinato con tecniche di microscopia a fluorescenza e citofluorimetria di flusso.

L'applicazione *in vivo* di queste ricerche prevede il trasferimento delle cellule staminali progenitrici di cardiomiociti al tessuto cardiaco necrotico. Il tessuto cardiaco sottoposto a innesto cellulare sarà utilizzato al fine di valutare l'efficacia del processo di rigenerazione del miocardio, specialmente mediante tecniche di biologia molecolare, immunoistochimica ed elettrofisiologia. In particolare, in modelli di ratto con infarto miocardico, sarà monitorata l'evoluzione temporale del recupero della normale propagazione dell'eccitamento nel tessuto cardiaco rigenerato mediante l'impiego di cellule staminali, in vista inoltre di una caratterizzazione elettrofisiologica del tessuto neoformato e di una correlazione delle misure elettrofisiologiche con lo stato proliferativo e di differenziazione cellulare. Lo studio elettrofisiologico sarà mirato all'analisi delle proprietà elettriche passive del tessuto rigenerato, dipendenti dall'architettura miocardica, e dall'analisi delle proprietà elettriche attive miocitarie, dipendenti dai flussi ionici transmembranari responsabili del potenziale d'azione. Analoghi esperimenti saranno inoltre eseguiti a partire da cellule staminali con spiccate potenzialità vasculogenetiche, provenienti dal sangue periferico o dal midollo osseo, al fine di aumentare la superficie capillare coronarica nell'area ischemica. Altri studi infine valuteranno l'eventuale presenza di cellule staminali già esistenti nel cuore e il loro ruolo nei processi di rigenerazione del miocardio infartuato.

**Polimorfismi allelici ed espressione fenotipica di molecole proinfiammatorie per l'individuazione di gruppi a rischio di malattie cardiovascolari.** Dati recenti della letteratura internazionale indicano che alcune molecole coinvolte nella regolazione della flogosi quali la proteina C reattiva (PCR), e una citochina, l'interleuchina (IL)-6, sono aumentate nel plasma di pazienti con infarto miocardico o con angina instabile. Inoltre, i livelli plasmatici di queste due molecole costituiscono fattori di rischio per l'infarto e l'ictus cerebrale in quanto aumentano prima della manifestazione clinica e si mantengono elevati rispetto ai valori riscontrati nei soggetti che non presentano questo tipo di patologia.

Si è già dimostrato in altre patologie, quali la demenza di tipo Alzheimer, che le regioni di regolazione (promotori) dei geni localizzati sui due cromosomi

omologhi (alleli) codificanti per IL-1 $\beta$  presentano una spiccata variabilità della sequenza nucleotidica. Queste diversità di sequenza dei due alleli sono ampiamente rappresentate nella popolazione umana e prendono il nome di polimorfismi allelici. Essi sono dovuti principalmente a mutazioni delle singole basi e costituiscono un fattore di rischio per la malattia di Alzheimer poiché influenzano i livelli plasmatici di IL-1 $\beta$ . Questo programma di ricerca propone di studiare i polimorfismi allelici dei geni della PCR e dell'IL-6 in associazione ai livelli plasmatici delle rispettive proteine. Si provvederà anche a individuare le variazioni di sequenza nucleotidica del gene dell'apoE che è stato identificato come un fattore di rischio per malattie cardiovascolari.

Inizialmente sarà esaminata un'ampia casistica di soggetti con pregressa manifestazione clinica infartuale o ictus cerebrale e di controlli sani paragonabili per sesso ed età; in questi soggetti si procederà all'identificazione dei polimorfismi allelici noti della PCR e dell'IL-6 su analisi del DNA genomico estratto da leucociti circolanti. Questo primo studio casi-controlli permetterà di verificare se alcuni polimorfismi della PCR e/o dell'IL-6 influenzino il rischio di manifestazioni cardiovascolari e la loro indipendenza dal genotipo apoE. Se emergeranno associazioni interessanti fra genotipi PCR e IL-6 con l'infarto e l'ictus si procederà con un altro studio che consisterà nel seguire nel tempo un'ampia popolazione di soggetti apparentemente sani di età compresa fra i 40 ed i 60 anni. In questi soggetti verranno studiati i polimorfismi PCR e IL-6 e periodicamente misurati i livelli plasmatici delle proteine da essi codificati. Lo scopo è quello di verificare se tramite lo studio combinato genetico e fenotipico di questi marcatori si possano individuare gruppi ad alto rischio di sviluppare malattie cardiovascolari. Verranno anche esplorate le eventuali correlazioni fra PCR, IL-6 ed i parametri classici del metabolismo lipidico.

I risultati della ricerca dovrebbero favorire l'individuazione di gruppi ad elevato rischio di manifestazioni patologiche cardiovascolari nella popolazione senza precedenti clinici significativi. Sarà inoltre possibile eseguire il monitoraggio dei soggetti con incidenti cardiovascolari e utilizzare dei marcatori genotipici e fenotipici a scopo prognostico. Saranno inoltre proposti nuovi trial terapeutici con uso di farmaci antinfiammatori per la terapia della manifestazione in atto e della prevenzione di successivi episodi cardiovascolari, nonché l'uso di marcatori genotipi per impostare campagne di prevenzione delle patologie cardiovascolari su popolazioni ad alto rischio.

## Conclusioni

L'integrazione tra i gruppi di studio che si dedicano in maniera specialistica agli innumerevoli tasselli che compongono l'insieme non può che portare ad una visione più completa dei grandi temi di ricerca menzio-

nati e a una ricaduta, in termini di servizi sanitari e di miglioramento della qualità della vita, da offrire alla società. Noi ci auguriamo quindi che il CIRC possa rappresentare non solo un punto di convergenza di mezzi e intelligenze, ma che attraverso questo lavoro di coordinamento possa anche portare un cospicuo contributo a tutta la comunità.

L'esperienza acquisita durante questi 7 anni è stata veramente positiva, sia per le collaborazioni scientifiche intraprese, sia per la possibilità di ricevere adeguati finanziamenti per la ricerca. Infatti il Consiglio Direttivo, costituito dai Delegati di ogni sede universitaria, ha potuto disporre di fondi ricevuti dal MIUR (3 milioni di Euro), da privati, incluse Banche e Fondazioni (600 000 Euro) e dalle stesse Unità Operative, attraverso le quote di associazione (70 000 Euro).

Il CIRC si è fatto inoltre promotore di numerose attività scientifiche e culturali. Ricordiamo, tra le più significative, la mostra a carattere scientifico-divulgativo tenutasi a Bologna e Parma in occasione delle manifestazioni "Cuore 2000", i master annuali sul tema della

riabilitazione fisica dell'apparato cardiovascolare, il patrocinio di numerosi congressi tenuti in varie parti di Italia e la pubblicazione di alcuni testi ad ampia diffusione. Il Consorzio ha infine curato con particolare attenzione il processo di formazione dei giovani ricercatori, mediante l'assegnazione di più di 60 borse di studio, anche nell'ambito dei Dottorati e degli Assegni di Ricerca, nonché tramite lo svolgimento di lezioni e seminari tenuti in varie sedi universitarie da studiosi di chiara fama nazionale e internazionale.

### **Ringraziamenti**

Le ricerche del Consorzio Interuniversitario per la Ricerca Cardiovascolare sono state finanziate con contributi erogati dal MIUR e dalla Compagnia di San Paolo di Torino. Ringrazio inoltre la Giunta (Proff. C. Clo', F. Ledda, G. Mattioli e O. Visioli) per il lavoro svolto. Infine un ringraziamento al Prof. Claudio Muscari per la sua fattiva collaborazione.