



Università degli Studi di Palermo
Dipartimento di Medicina Interna, Malattie
Cardiovascolari e Nefrourologiche



**Dottorato in “*Scienze Cardiovascolari:
dalla Biologia Molecolare alla Clinica*”**

Ciclo XXIV
Coordinatore: Prof. Salvatore Novo

***Polimorfismo I/D del gene ACE:
possibile biomarcatore genetico della patologia
ipertensiva***

Coordinatore: *Ch.mo Prof. Salvatore Novo*

Tutor: *Ch.mo Prof. Marcello Ciaccio*

Dottoranda: Dott.ssa Bruna Lo Sasso

SSD BIO/12

Anno Accademico 2012-2013

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	3
2. LA PATOLOGIA IPERTENSIVA	6
<i>2.1 Classificazione della pressione arteriosa</i>	<i>7</i>
<i>2.2 Ruolo della disfunzione endoteliale</i>	<i>10</i>
3. SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE (RAAS).....	14
<i>3.1 Ruolo dell'angiotensina II.....</i>	<i>23</i>
4.ENZIMA DI CONVERSIONE DELL'ANGIOTENSINA (ACE)	28
<i>4.1 Gene ACE.....</i>	<i>28</i>
<i>4.2 Proteina ACE</i>	<i>30</i>
<i>4.3 Polimorfismo I/D del gene ACE.....</i>	<i>31</i>
5. PROTOCOLLO SPERIMENTALE.....	34
<i>5.1 Obiettivo dello studio.....</i>	<i>34</i>
<i>5.2 Pazienti, materiali e metodi</i>	<i>34</i>
<i>5.3 Estrazione del DNA.....</i>	<i>35</i>
<i>5.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR).....</i>	<i>35</i>
6.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	37
BIBLIOGRAFIA	42

1. Introduzione

Le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte e una delle principali cause di invalidità nel mondo[1]. Tra i principali fattori di rischio un ruolo di primaria importanza è dato dall'età, dal sesso maschile, dalla presenza di patologie come il diabete mellito, l'ipertensione arteriosa, l'ipercolesterolemia e condizioni legate allo stile di vita come il fumo e lo stress. La ricorrenza di queste patologie nella storia familiare degli individui indica anche una chiara predisposizione genetica allo sviluppo di tutte le patologie caratterizzate dalla tendenza a soffrire di episodi trombotici.

Negli ultimi anni è, quindi, sorta la necessità di identificare eventuali marcatori genetici di rischio cardiovascolare allo scopo di permettere lo sviluppo di nuove misure preventive e terapeutiche. I geni di suscettibilità agli eventi cardiovascolari sono delle varianti geniche che presentano una tale frequenza nella popolazione da essere considerate delle varianti polimorfiche. Quantificare il rischio relativo per i singoli polimorfismi è difficile, tuttavia le linee guida invitano a tener presente la combinazione di varianti polimorfiche e fattori ambientali esterni, per migliorare le capacità predittive del calcolo di “rischio cardiovascolare”. I geni finora studiati sono quelli che possono avere un ruolo chiave in processi legati al controllo della coagulazione, al metabolismo lipidico, geni regolatori della pressione arteriosa e del metabolismo dell'omocisteina. Tra i fattori di rischio per le patologie cardiovascolari l'ipertensione gioca un ruolo fondamentale.

L'ipertensione arteriosa è una delle malattie a più larga diffusione e costituisce la principale causa di molte patologie invalidanti quali l'angina pectoris, l'infarto miocardico, l'ictus cerebrale, la nefropatia e la retinopatia. Essa è, inoltre, determinante per lo sviluppo dell'aterosclerosi e del danno d'organo cerebrale, cardiaco e renale.

Nello studio dell'ipertensione arteriosa e delle sue complicanze a lungo termine, un ruolo chiave è rappresentato dal Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS).

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è una complessa cascata enzimatico proteica che, attraverso la generazione di mediatori cellulari, gioca un ruolo importante nel controllo della pressione sanguigna e del tono vascolare e nella omeostasi idrosalina e del volume plasmatico regolando le funzioni renali; uno squilibrio di uno dei suoi componenti può portare all'insorgenza dell'ipertensione arteriosa. Tra i vari componenti proteici, un ruolo di primaria importanza è fornito dall'angiotensina II e dall'enzima di conversione dell'angiotensinogeno (ACE).

Quest'ultimo è stato oggetto di notevole attenzione negli ultimi anni come candidato nella patogenesi di numerosi condizioni tra cui il diabete [2], l'ipertensione [3], le malattie cardiovascolari [4] e la nefropatia diabetica [5]. Cambien et al. furono i primi a dimostrare l'associazione tra il polimorfismo inserzione/delezione (I/D) del gene ACE e l'infarto miocardico acuto (IMA); in particolare evidenziarono una più alta prevalenza del genotipo DD nel gruppo di pazienti con IMA [6]. Una metanalisi recente ha confermato tale associazione indicando l'allele D del polimorfismo I/D del gene ACE un possibile fattore di rischio per infarto del miocardio [7].

Altri studi a seguire hanno osservato un'associazione tra variante polimorfica inserzione/delezione e diabete tipo 2; in particolare uno studio effettuato su una popolazione cinese, ha presentato l'allele D come un possibile marker di rischio per lo sviluppo di malattie cardiovascolari. Infatti i soggetti omozigoti per tale allele mostravano un sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) maggiormente attivato, una predisposizione maggiore a sviluppare lesioni vascolari ed una maggiore prevalenza di dislipidemia, in particolare, elevati livelli plasmatici di trigliceridi [8].

Alla luce delle attuali conoscenze e dei dati di letteratura riportati, il mio studio si è focalizzato sull'analisi del polimorfismo I/D del gene ACE in un gruppo di soggetti ipertesi *versus* un gruppo di soggetti normotesi, per valutare ed approfondire l'associazione tra la variante polimorfica inserzione /delezione del gene ACE nel contesto della patologia ipertensiva.

2. La patologia ipertensiva

L'ipertensione arteriosa oggi è una delle malattie a maggiore incidenza nei paesi industrializzati e spesso molti soggetti non sono a conoscenza del loro stato patologico, se non prima della comparsa di un evento eclatante. Complessivamente la prevalenza dell'ipertensione sembra essere pari al 30-45% della popolazione generale, con un incremento legato all' invecchiamento [9]. Nel 2008 circa il 40% degli adulti sopra i 25 anni mostrava tale patologia . Il numero di persone con tale condizione è passato da 600 milioni nel 1980 ad 1 miliardo nel 2008. La prevalenza più alta si riscontra in Africa (46%), mentre i Paesi ad alto reddito mostrano una prevalenza minore (35%).

Si prevede un incremento di circa il 60% per il 2025, raggiungendo così un totale di 1,56 miliardi di casi [10-11].

L'ipertensione arteriosa è uno dei maggiori fattori di rischio per patologie cardiovascolari costituendo la principale causa di molte malattie invalidanti quali l'angina pectoris, l'infarto miocardico, l'ictus cerebrale, la nefropatia e la retinopatia [12]. L'ipertensione è una patologia caratterizzata da un aumento considerevole della pressione sanguigna con valori oltre la norma. Livelli di pressione normale corrispondono a valori di 120/80 mmHg.

Secondo le ultime linee guida del 2013, l'ipertensione è definita da valori di pressione arteriosa superiori o uguali a 140/90, identificando uno stato di pre-ipertensione per valori tra 130/85 e 139/89 [9] (Tab. 1).

Il target pressorio che deve essere raggiunto nel paziente trattato è oggi identificato nei seguenti livelli tensivi: < 140/90 mmHg nell'iperteso non complicato, < 130/80 mmHg nell'iperteso che sia anche affetto da diabete mellito o insufficienza renale cronica [13].

Category	Systolic		Diastolic
Optimal	<120	and	<80
Normal	120–129	and/or	80–84
High normal	130–139	and/or	85–89
Grade 1 hypertension	140–159	and/or	90–99
Grade 2 hypertension	160–179	and/or	100–109
Grade 3 hypertension	≥180	and/or	≥110
Isolated systolic hypertension	≥140	and	<90

Tabella 1. Definizione e classificazione dei livelli di pressione sanguigna (mmHg).

2.1 Classificazione dell'Ipertensione

L'ipertensione può essere classificata in:

- **essenziale**, in cui non è definibile la causa determinante la malattia;
- **secondaria**, quando è causata da altre patologie, soprattutto renali ed endocrine;
- **iatrogena**, quando è determinata da trattamenti farmacologici;
- **altre cause**, come la coartazione aortica, tossiemia gravidica (gestosi del III trimestre), abuso di liquirizia.

L'ipertensione detta essenziale ha un'origine sconosciuta ed è molto frequente: quasi il 90% degli ipertesi soffre di questo tipo di ipertensione.

Numerosi fattori sono certamente importanti nella manifestazione dell'ipertensione essenziale, per esempio l'ereditarietà, la razza, la dieta, il regime di vita, l'età.

Spesso l'invecchiamento è accompagnato da ipertensione anche nei soggetti che non hanno mai manifestato tale patologia.

I valori di normalità possono essere influenzati anche dall'ora del giorno: più alti al mattino, appena svegli, si riducono durante la giornata e tendono a rialzarsi verso sera.

L'ipertensione arteriosa, soprattutto nelle fasi iniziali, non produce dei sintomi caratteristici e facilmente riconoscibili; l'unico modo per scoprire di essere ipertesi è quello di controllare periodicamente la pressione. Per un adulto sano e senza altri disturbi associati, un controllo annuale è sufficiente.

Non sempre valori elevati di pressione sono il segnale di una reale ipertensione. Questo perché situazioni di stress possono temporaneamente portare a un innalzamento della pressione, che scompare però quando termina il periodo di tensione fisica e/o psicologica.

L'ipertensione secondaria può avere due cause:

- **causa renale**, che può risultare da un'alterata secrezione di molecole vasoattive da parte del rene, in seguito a modifiche del tono arteriolare sistemico o renale (ad esempio, in seguito a stenosi dell'arteria renale o a involuzione fibrotica del parenchima renale) o da un aumento del volume plasmatico, in seguito all'alterazione dell'omeostasi corporea di liquidi e sali
- **causa endocrina**, in seguito a iperaldosteronismo primario o secondario, ipercortisonemia, in presenza di feocromocitoma, di acromegalia o iperparatiroidismo [14].

L'ipertensione è una condizione patologica multifattoriale su base poligenica, dipendente cioè dalla complessa interazione tra fattori ambientali e l'attività di diversi geni. Proprio perché la sua genesi è multifattoriale, diversi meccanismi possono giocare un ruolo differente nei singoli individui:

Ruolo dell'ereditarietà: esiste, sicuramente, una predisposizione familiare a sviluppare l'ipertensione. Il carattere non può essere collegato ad un singolo gene trasmesso secondo le leggi di Mendel, ma è più verosimilmente legato ad interazioni geniche multiple.

Apporto dietetico di sodio: il fabbisogno minimo di sodio, per un adulto, è di circa 400 mg al giorno. Il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) e la natriuresi da aumenti pressori sono fondamentali per regolare la pressione arteriosa, tanto che è possibile ingerire con gli alimenti dosi 50 volte più elevate di sale senza che vi siano variazioni di pressione.

Tuttavia, studi epidemiologici hanno dimostrato che l'ipertensione essenziale è più frequente nelle popolazioni che, mediamente, introducono un maggiore quantitativo dietetico di sale.

Influenza del sistema simpatico: gli ipertesi hanno, in media, una frequenza cardiaca leggermente più alta rispetto ai normotesi. Sembra, infatti, che nell'ipertensione essenziale vi sia un aumento della noradrenalina nel plasma e una maggiore sensibilità dei vasi all'attività costrittrice della noradrenalina [15].

2.2 Ruolo della disfunzione endoteliale

La disfunzione endoteliale rappresenta una matrice patogenetica comune a tutte le condizioni di rischio cardiovascolare e, come tale, costituisce un possibile endpoint di intervento nelle strategie di prevenzione [16]. Recenti studi e dati epidemiologici hanno evidenziato un modello di sviluppo patogenetico univoco del danno vasale, collegato all'ipertensione arteriosa e all'aterosclerosi [17].

L'ipertensione costituisce un fattore di rischio per l'insorgenza di aterosclerosi, colpendo le arterie di grande e medio calibro, in particolare le coronarie.

Un importante fattore che contribuisce alle disfunzioni vascolari nell'ipertensione è lo stress ossidativo che induce infiammazione del tessuto vascolare, migrazione delle cellule proinfiammatorie, aumento dell'espressione di geni proinfiammatori redox-sensibili e accumulo di proteine e fibrosi [18]. Inoltre si assiste ad un aumento della crescita delle cellule muscolari lisce vasali, ed alterazioni strutturali causate dagli effetti a lungo termine delle proteine vasocostrittrici tra cui la più importante è l'angiotensina II [19]. Questi processi sono alla base del rimodellamento cardiovascolare e della disfunzione endoteliale indotti a lungo termine dall'ipertensione arteriosa in associazione allo stress ossidativo [20-21-22] (Fig. 1).

L'endotelio è uno dei maggiori regolatori dell'omeostasi vascolare, mantiene l'equilibrio tra la vasodilatazione e la vasocostrizione, tra la trombogenesi e la fibrinolisi e l'equilibrio tra l'inibizione e la stimolazione della proliferazione e della migrazione delle cellule del muscolo liscio.

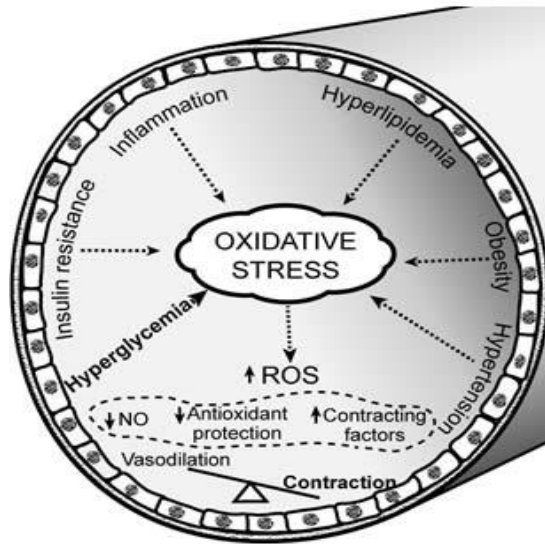


Figura 1. Fattori inducenti la disfunzione endoteliale.

Quando questi equilibri vengono alterati segue la disfunzione endoteliale, causando danni alla parete arteriosa [17].

Il mantenimento del tono vascolare è regolato dal rilascio di numerose sostanze vasodilatatrici e vasocostrittrici.

Tra le sostanze vasodilatatrici rilasciate dall'endotelio, ha una rilevanza particolare il monossido di azoto (NO), inizialmente identificato come fattore rilassante di derivazione endoteliale (Endothelium-Derived Relaxing Factor, EDRF) e prodotto a partire dalla L-arginina. Fisiologicamente, l'ossido nitrico è prodotto dalle cellule endoteliali per effetto dell'acetilcolina (dopo stimolazione parasimpatica) o come conseguenza dello stress longitudinale esercitato sulle pareti arteriose [23]. L'ossido nitrico svolge un ruolo nella regolazione della pressione arteriosa; dati di laboratorio, infatti, evidenziano che la somministrazione di L-arginina inibisce la produzione di NO determinando un effetto ipertensivo in cavie da laboratorio. Altri vasodilatatori noti sono la prostaciclina che agisce in sinergia con l'ossido nitrico per inibire l'aggregazione piastrinica e la bradichinina che stimola il rilascio di NO e prostaciclina.

La bradichinina stimola anche la produzione dell'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA) e, quindi, può svolgere un importante ruolo nella fibrinolisi [23-24].

L'endotelio produce anche sostanze vasocostrittrici come, ad esempio, l'endotelina e l'angiotensina II. Quest'ultima non solo agisce da vasocostrittore, ma è anche un pro-ossidante e stimola la produzione di endotelina. Endotelina e angiotensina II promuovono la proliferazione delle cellule del muscolo liscio, contribuendo in tal modo alla formazione della placca aterosclerotica [23]. Il principale fattore enzimatico implicato nella produzione delle specie reattive dell'ossigeno è la NAD(P)H ossidasi, attivata da un grande numero di stimoli pro-aterogenetici inclusa l'angiotensina II [25-26]. È stato dimostrato che le LDL ossidate incrementano l'espressione genica e la traduzione dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) e che l'angiotensina II (prodotto di tale enzima) induce l'ossidazione delle LDL nei macrofagi. Quindi l'ossido di azoto e l'angiotensina II esercitano effetti opposti sulla funzione endoteliale, mantenendo l'equilibrio del tono vascolare [27]. L'angiotensina II e la bradichinina hanno effetti opposti sulla fibrinolisi, in quanto i metaboliti dell'angiotensina incrementano l'attività del PAI-1, mentre la bradichinina incrementa i livelli del t-PA [28]. La disfunzione endoteliale è caratterizzata da un alterato tono muscolare della parete vasale (ridotto rilasciamento e/o aumentata costrizione), rapida crescita delle cellule muscolari lisce della parete, anomalie del processo coagulativo e fibrinolitico (iperaggregazione piastrinica, tendenza protrombotica, ridotta liberazione di t-PA e u-PA) e, infine, dall'induzione di fenomeni infiammatori (ad es., citochine, chemochine e molecole di adesione). Successivamente si sviluppano alterazioni strutturali di parete, come l'ipertrofia delle cellule muscolari lisce, il rimodellamento della parete, la rottura della placca ateromasica, la formazione di trombi e, per ultimo, l'occlusione del lume vasale [24-26-28].

Sotto l'influenza di fattori rilasciati dall'endotelio, le cellule vascolari del muscolo liscio sono anche capaci di rilasciare citochine e fattori di regolazione della crescita che possono influenzare il fenotipo e lo sviluppo delle stesse cellule. I ben noti fattori di rischio cardiovascolari, come la dislipidemia, l'elevata pressione sanguigna, il diabete e il fumo, possono generare una disfunzione endoteliale alterando lo stato ossidativo cellulare delle pareti vasali. La dislipidemia, in particolare, è associata ad un incremento di anioni superossido e all'ossidazione delle LDL.

Lo stress ossidativo induce l'espressione di geni redox-sensibili, che esprimono per proteine chemotattiche e molecole di adesione leucocitaria, e favorisce l'up-regulation di geni pro-infiammatori [24-26-29]. E' noto che la disfunzione endoteliale che si accompagna all'ipertensione, compaia precocemente in soggetti in età adolescenziale con predisposizione familiare per l'ipertensione. Questo lascia presupporre che i vasi di soggetti predisposti geneticamente siano programmati a sviluppare precocemente la malattia ipertensiva [30-31].

3. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS)

Il mantenimento dei valori pressori entro determinati limiti è essenziale per consentire un'adeguata perfusione di sangue a tutti i distretti corporei e, viceversa, limitare i danni vascolari provocati da una pressione elevata. Esistono dunque dei sistemi di regolazione della pressione sanguigna che possono agire in tempi differenti: rapidi (entro pochi secondi e/o minuti) oppure a medio – lungo termine (entro ore o giorni) (Fig. 2).

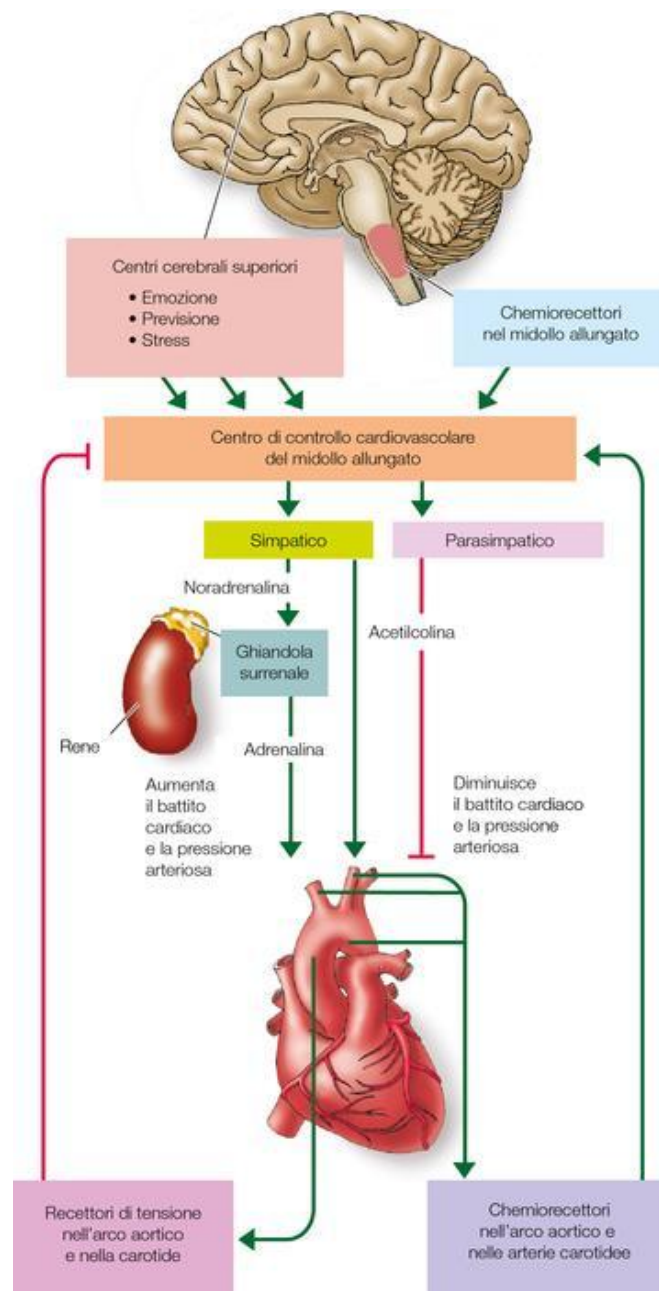


Figura 2. Meccanismi di controllo della pressione arteriosa.

Tra i meccanismi che entrano in funzione entro alcuni minuti dall'instaurarsi di variazioni della pressione arteriosa, il più importante è rappresentato dal sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) [32].

Alla luce delle attuali conoscenze il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) è considerato, tra i meccanismi fisiopatologici connessi all'ipertensione arteriosa, uno dei principali mediatori del danno cardiovascolare [27-33].

Il sistema renina-angiotensina è coinvolto nella regolazione della pressione sanguigna e nella regolazione elettrolitica dei fluidi.

Le alterazioni di questo sistema contribuiscono in maniera determinante alla patofisiologia dell'ipertensione, della malattia renale e dell'insufficienza cardiaca congestizia [27].

I componenti principali di questo sistema sono:

- l'angiotensinogeno, proteina globulare prodotta dal fegato e substrato per la renina;
- la renina, enzima che catalizza la conversione proteolitica dell'angiotensinogeno nel decapeptide angiotensina I (Ang I);
- l'enzima di conversione dell'angiotensina (Angiotensin Converting Enzyme - ACE), una dipeptidil-carbossipeptidasi (prodotta soprattutto a livello polmonare) che converte l'angiotensina I nell'octapeptide angiotensina II (Ang II);
- i recettori dell'angiotensina II responsabili della trasduzione del segnale [34].

La pressione arteriosa è regolata dalla liberazione di una sostanza prodotta dall'apparato juxtaglomerulare renale, la renina, rilasciata dalle cellule granulari del glomerulo in risposta a vari stimoli; essa è prodotta a partire da un precursore chiamato preprorenina, che viene metabolizzato in prorenina e scisso ulteriormente in renina.

Tale meccanismo avviene nelle cellule iuxtaglomerulari e in molti altri tessuti quali il cervello, le cellule endoteliali del sistema vascolare periferico, le gonadi, la midollare e la corticale del surrene. La produzione di renina nell'apparato iuxtaglomerulare resta comunque la sede di sintesi più importante. L'apparato iuxtaglomerulare è costituito dalle cellule granulose presenti nella parte terminale dell'arteriola afferente e dalle cellule della macula densa che si trovano a stretto contatto con il tubulo contorto prossimale nella sua porzione terminale (Fig. 3).

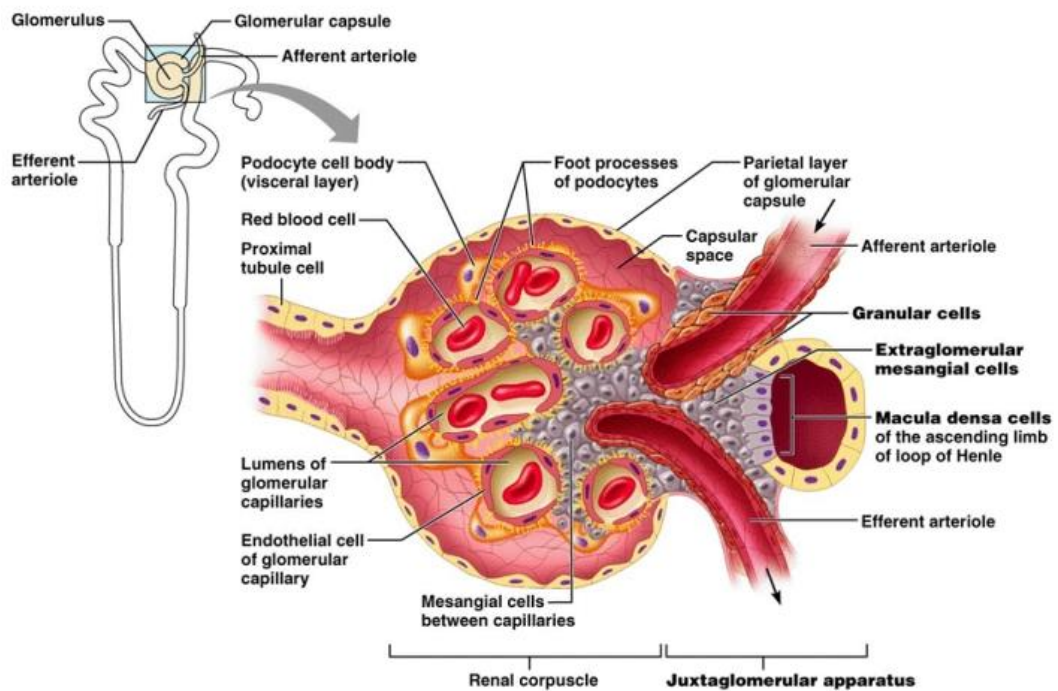


Figura 3. Rappresentazione schematica di un glomerulo renale.

Le cellule granulose sono destinate alla produzione di renina che viene sintetizzata e liberata sotto l'influenza di particolari stimoli. Questi stimoli sono rappresentati dall'eccitazione del barostato renale, funzione che viene esercitata dalle cellule granulose dell'arteriola afferente: ad una ridotta pressione di perfusione corrisponde

un' aumentata produzione di renina, viceversa accade se i livelli pressori sono aumentati. Un eccesso di potassio al contrario sopprime la produzione di renina. La stimolazione dei recettori β -adrenergici induce la produzione di renina, così come la riduzione del carico di sodio a livello del tubulo prossimale ed in tal caso si verifica una marcata riduzione dell'assorbimento di acqua che stimola la produzione di renina. La funzione della macula densa è, dunque, quella di sensore della concentrazione di sodio al termine del tubulo contorto prossimale.

In caso di diminuzione della pressione arteriosa, nelle cellule juxtaglomerulari dell'arteriola afferente del glomerulo renale viene sintetizzata e rilasciata la renina.

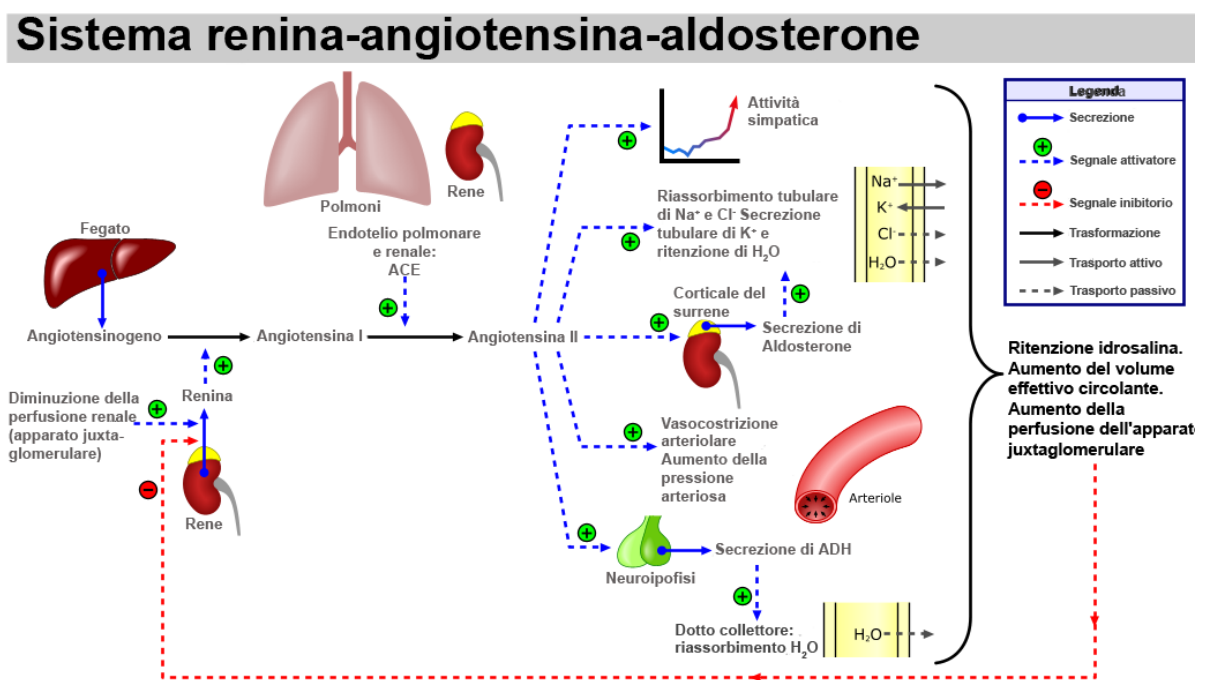


Figura 4. Sistema renina-angiotensina-aldosterone.

La renina converte l'angiotensinogeno in angiotensina I, la quale possiede un'azione vasocostrittrice modesta. L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) che si trova prevalentemente nei capillari polmonari converte l'Angiotensina I in Angiotensina II,

potente vasocostrittore che induce indirettamente la ritenzione di sodio e acqua, stimolando la produzione di aldosterone da parte delle ghiandole surrenali [35].

I componenti del sistema RAAS sono stati isolati in diversi tessuti come rene, cervello, cuore e vasi sanguigni, dimostrando un probabile ruolo come regolatore locale del normale funzionamento dei vari organi. Nel cuore ad esempio è implicato nell'ipertrofia in risposta al carico pressorio e nel rimodellamento del miocardio dopo infarto [36]. Negli ultimi anni si è osservata la presenza dei componenti del sistema renina-angiotensina a livello del tessuto adiposo.

Inizialmente è stata dimostrata l'espressione dell'angiotensinogeno a livello del tessuto adiposo perivascolare [37]. In seguito numerose evidenze hanno rilevato l'espressione dell'angiotensinogeno durante la differenziazione degli adipociti [38].

Più recentemente diversi ricercatori hanno osservato che gli adipociti umani esprimono i geni del sistema renina-angiotensina-aldosterone incluso l'ACE e i recettori AT1 e AT2 [39]. Inoltre sono stati identificati recettori della renina a livello del tessuto adiposo umano [40] e la concomitante presenza di ACE2 [41].

Frigolet et al. recentemente hanno messo in evidenza che la sintesi dei componenti RAAS ad opera degli adipociti è amplificata nei soggetti obesi. Di conseguenza, l'incremento di questi fattori sembra essere responsabile di alcune patologie che si riscontrano nell'obesità (ipertensione, insulina resistenza, diabete) [42]. In definitiva il tessuto adiposo possiede un corredo sufficiente alla sintesi e alla risposta all'angiotensina II.

L'esatta funzione biologica del RAAS a livello del tessuto adiposo non è nota; tuttavia l'aumento dell'espressione e della secrezione di angiotensinogeno è una delle caratteristiche della differenziazione dei preadipociti ed è considerata un marcatore tardivo della differenziazione degli adipociti.

Un altro componente fondamentale del sistema renina-angiotensina-aldosterone è l'angiotensina II che modula la contrazione, la crescita cellulare, la differenziazione e l'apoptosi; può favorire, inoltre, la produzione di citochine, l'espressione di molecole di adesione e il conseguente richiamo di cellule di infiammazione, la chemiotassi, l'attivazione dei macrofagi, la crescita dei fibroblasti e la sintesi delle proteine della matrice extracellulare attivando il processo di rimodellamento tissutale. Presenta, quindi, un'azione proinfiammatoria e stimola la produzione di numerosi fattori di crescita come PDGF, PDGFR, recettori per l'insulina e vasocostrittori come ET-1 [43]. Inoltre, l'angiotensina II risulta essere un potente mediatore di stress ossidativo capace di stimolare la liberazione di citochine e l'espressione di molecole di adesione leucocitarie le quali, a loro volta, inducono fenomeni infiammatori di parete (Fig.5).

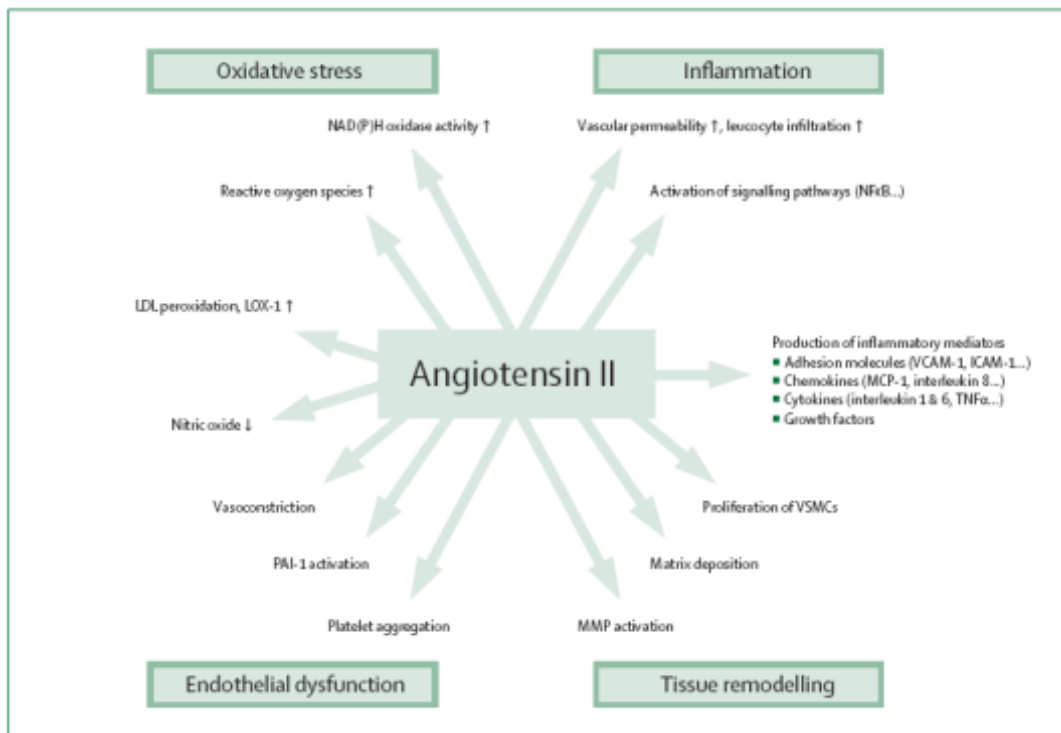


Figura 5. Effetti biochimici dell'angiotensina II.

Le molecole pro-infiammatorie determinano a loro volta la produzione di diversi enzimi, tra cui l'ACE che, aumentando localmente la produzione di angiotensina II, moltiplica a cascata il processo infiammatorio, attivando un meccanismo a feedback positivo.

L'angiotensina II rappresenta inoltre un fattore di crescita per le cellule muscolari lisce vasali ed induce la formazione di metalloproteinasi e PAI-1; essa promuove, oltre che vasocostrizione, anche infiammazione, trombosi e rimodellamento vasale [26-34].

L'angiotensina II esplica il suo ruolo attraverso il legame con due tipi di recettori presenti sulla superficie endoteliale (Fig. 6):

- il recettore AT1 (AT1R)
- il recettore AT2 (AT2R)

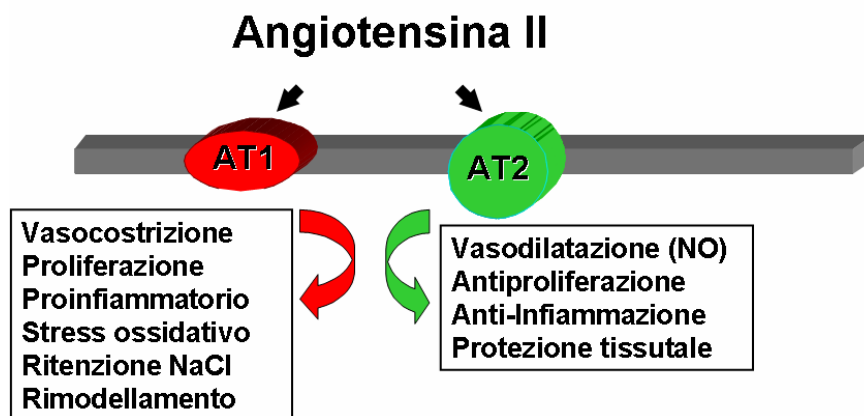


Figura 6. Recettori AT1 e AT2 dell'angiotensina II.

L'AT1R appartiene alla superfamiglia di recettore con 7 domini transmembrana accoppiati a proteina G, con un classico sistema di secondi messaggeri che mediano un signalling a breve termine che comprende i ben noti effetti emodinamici ed endocrini mediati dall'angiotensina II ed uno a lungo termine attuato essenzialmente attraverso la

modulazione dello stato ossidativo della cellula che determina i processi di rimodellamento cardiovascolare. Diversi studi suggeriscono che l'attivazione di AT1R media i più noti effetti biologici dell'angiotensina II nei tessuti cardiovascolari.

Si è osservato, infatti, che inibitori dell'ACE e del recettore AT1 migliorano la funzione endoteliale e riducono le lesioni ischemiche del miocardio.

Il recettore dell'angiotensina II AT2, scoperto più recentemente nel 1993 è, come l'AT1R, un recettore a 7 domini transmembrana accoppiato a proteina G con 34% di omologia con la sequenza aminoacidica di AT1R.

L'angiotensina II lega il recettore AT2 con meno affinità rispetto all' AT1R ed il signalling mediato da AT2R non è ancora chiaro, anche se evidenze sperimentali fanno ipotizzare che i segnali diretti da questo recettore controbilancino gli effetti mediati dal recettore AT1; sono infatti implicati nell'antiproliferazione, nella differenziazione cellulare, nei segnali antiapoptotici e nella rigenerazione neuronale; possono indurre vasodilatazione e inibire il segnale implicato nel processo infiammatorio ed hanno quindi un ruolo omeostatico di controbilanciare un eccesso di stimolazione di AT1R (Fig.6). L'attivazione dei recettori per l'angiotensina II e per le LDL ossidate (ox-LDL), ovvero LOX-1, sembra essere implicata nella patogenesi dell'aterosclerosi, dell'ipertensione e del danno ischemico, inducendo la vasocostrizione locale, la disfunzione endoteliale e l'aggregazione piastrinica [24-28-44].

È noto, infatti, che l'interazione tra dislipidemia e attivazione di sistemi neurormonali, come il sistema renina-angiotensina-aldosterone, può, non solo spiegare la frequente coesistenza di ipertensione e dislipidemia, ma gioca anche un ruolo importante nella patogenesi dell'aterosclerosi. Studi sperimentali suggeriscono che gli effetti dell'angiotensina II e delle lipoproteine sul rischio aterogenico non sono indipendenti.

Infatti, in media, oltre il 40% degli uomini e il 33% delle donne con valori di pressione sanguigna di 145/90 mm Hg, o superiore, sono anche dislipidemici, facendo supporre una relazione diretta tra ipertensione e iperlipidemia [45].

Entrando nel dettaglio delle scelte terapeutiche non c'è dubbio che i più moderni farmaci antiipertensivi (ACE-inibitori, inibitori del recettore per angiotensina II, calcio-antagonisti in particolare) siano dotati di una maggiore flessibilità d'azione e capaci di un migliore controllo dell'ipertrofia ventricolare sinistra, del danno retinico e delle lesioni vascolari. In particolare i farmaci ACE-inibitori bloccano l'azione dell'ACE impedendo la trasformazione di angiotensina I in angiotensina II e quindi, in definitiva, contrastano il rialzo della pressione arteriosa.

Inoltre, trial clinici sugli ACE-inibitori hanno documentato gli effetti benefici di questa classe di farmaci nel trattamento e nella prevenzione della malattia cardiovascolare con notevole riduzione degli eventi vascolari cerebrali e coronarici nonostante un modesto effetto sull'abbassamento della pressione arteriosa. Questi dati suggeriscono che gli ACE-inibitori possono anche esercitare un'azione diretta sui vasi sanguigni, oltre ai loro effetti emodinamici [27]. I farmaci che antagonizzano il sistema RAAS avrebbero, in teoria, le maggiori potenzialità per ridurre il danno d'organo collegato all'ipertensione [46].

3.1 Ruolo dell'angiotensina II

L'angiotensina II, oltre ad essere un ormone che esercita azione emodinamica e diretta sul rene, è un mediatore locale, biologicamente attivo, che ha effetti diretti sull'endotelio e sulle cellule muscolari lisce (Tabella 2).

Essa gioca un ruolo chiave nell'induzione dei processi correlati all'instaurarsi dell'ipertensione arteriosa attraverso il suo segnale sia a breve (stimolazione della contrazione della muscolatura liscia vasale) che a lungo termine, (induzione della crescita cellulare, aumento dei costituenti della matrice extracellulare, induzione della migrazione cellulare e dell'infiammazione). La sua importanza è dimostrata dalla comprovata efficacia di farmaci che, attraverso il loro meccanismo d'azione, riducono la produzione di angiotensina II o modulano negativamente il segnale che essa trasduce (ACE inibitori e bloccanti del recettore AT1 dell'angiotensina II).

Vascular Effect	Manifestation
Vasoconstriction	Stimulates Ang II type 1 receptor stimulation Releases endothelin and norepinephrine Reduces NO bioactivity and produces peroxynitrite
Inflammation	Activates NADH/NADPH oxidase and produces superoxide anion Induces expression of MCP-1, VCAM, TNF- α , IL-6 Activates monocytes/macrophages
Remodeling	Stimulates smooth muscle migration, hypertrophy, and replication Induces PDGF, bFGF, IGF-1, TGF- β expression Stimulates production of matrix glycoproteins and metalloproteinases
Thrombosis	Stimulates PAI-1 synthesis and alters tPA/PAI-1 ratio Activates platelets with increased aggregation and adhesion

Tabella 2. Effetti dell'angiotensina II sull'endotelio.

Una delle azioni più importanti dell'angiotensina II consiste nella sua attività vasocostrittrice diretta, con la riduzione del raggio medio arteriolare e conseguente aumento della pressione sanguigna.

Tale attività ha importanti effetti a livello renale, dove provoca una riduzione del filtrato glomerulare ed una diminuzione della superficie filtrante, determinando la contrazione della parete arteriolare a monte delle arteriole efferenti e facilitando il riassorbimento di sodio e acqua nei tubuli prossimali.

L'angiotensina II induce alterazione endoteliale e attiva l'espressione dei fenotipi pro-infiammatori delle cellule vascolari del muscolo liscio; essa è anche coinvolta nel rimodellamento vascolare agendo come un fattore di crescita sulle cellule vascolari e può stimolare la sintesi e il rilascio di glicoproteine di matrice e metallo proteinasi [27].

L'angiotensina II svolge un ruolo anche a livello della corteccia surrenalica, dove stimola la produzione di aldosterone.

Questo ormone è di primaria importanza in quanto determina il riassorbimento di sodio e acqua a livello del tubulo contorto distale, provocando un aumento della massa circolante e, dunque, della pressione arteriosa.

Un terzo meccanismo d'azione dell'angiotensina II è quello svolto sulla ghiandola pituitaria, dove determina il rilascio dell'ormone antidiuretico o vasopressina (ADH) che esplica la sua azione a livello del dotto collettore favorendo il riassorbimento di acqua giocando, così, un ruolo importante nella regolazione del volume plasmatico. Se l'aggettivo "antidiuretico" esprime in modo chiaro l'azione fisiologica di questo ormone altrettanto si può dire del sinonimo "vasopressina". L'ADH, infatti, possiede una seconda importante azione legata alla sua capacità vasocostrittrice: diminuendo il calibro delle arteriole, la vasopressina è capace di aumentare la pressione arteriosa anche in maniera sensibile quando è secreta in quantità elevate.

L'angiotensina II determina anche l'inattivazione di due peptidi vasodilatatori: la bradichinina e callidina (rilasciata dal chinogeno a basso peso molecolare).

La bradichinina fa parte del gruppo delle chinine plasmatiche e si forma in seguito alla scissione del suo precursore, chininogeno o bradichininogeno, associato alle globuline plasmatiche. La scissione di tale precursore è operata da un grande numero di sostanze di origine endogena o esogena, tra cui le callicreine tissutali.

In condizioni fisiologiche normali la formazione di bradichinina è quantitativamente molto limitata. Un'overproduzione di bradichinina si ha nel corso di fenomeni anafilattici, stati infiammatori e shock traumatici.

Tra le attività di maggiore importanza della bradichinina vanno elencate: l'azione vasodilatatrice che risulta dieci volte più intensa di quella posseduta dall'istamina, l'aumento della permeabilità vascolare osservabile soprattutto a livello dei capillari e delle piccole venule, l'intervento nei meccanismi infiammatori come agente umorale direttamente responsabile dei fenomeni caratteristici di arrossamento, dilatazione vasale, gonfiore, mobilitazione di leucociti e dolore.

Le scoperte sul ruolo fisiologico della bradichinina hanno fornito un importante progresso delle conoscenze sulla genesi della risposta infiammatoria, della sintomatologia allergica e sui meccanismi umorali che regolano la funzione cardiocircolatoria.

È per questa ragione che, sia pure raramente, la terapia con inibitori dell'enzima convertitore dell'angiotensina può determinare la comparsa di edemi dovuti ad un eccesso di attività di questi enzimi vasodilatatori.

L'angiotensina II può essere direttamente prodotta nelle cellule endoteliali dei vasi del miocardio, dopo che questo ha subito un danno, provocando ipertrofia e fibrosi

miocardica. L'attività di questo fattore sulla pressione arteriosa e sul cuore non si esaurisce in questi effetti diretti.

Di recente, infatti, è stato dimostrato che, accanto al classico enzima convertitore dell'angiotensina (ACE), ne esiste un secondo, *ACE 2*, che agisce sull'angiotensina I, principalmente nel rene e nel cuore e che induce la formazione di un eptapeptide, angiotensina 1-7 (Fig. 7). Il ruolo potenziale di questo eptapeptide si è visto, recentemente, essere cardioprotettivo con azione vasodilatatrice, anticrescita e anti-proliferante [35-47].

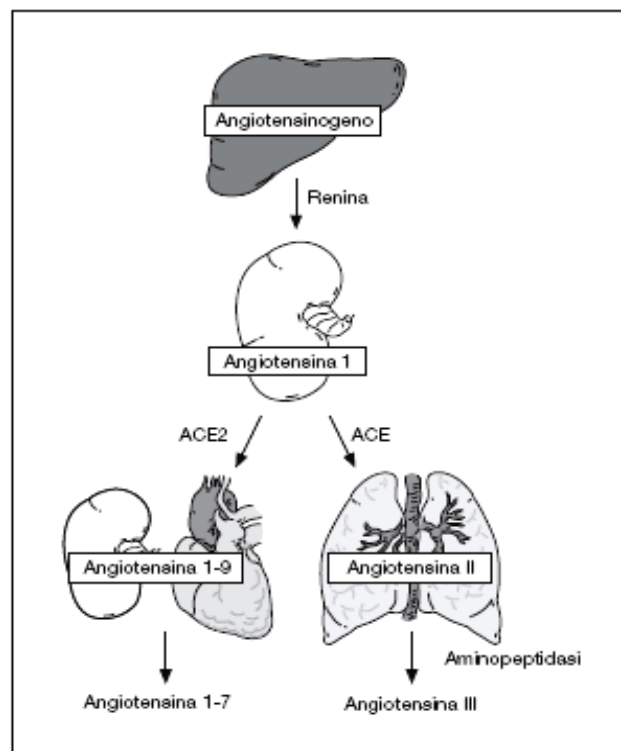


Figura 7. Schema semplificato dell'attività di ACE e ACE2.

Inoltre l'angiotensina II prodotta dall'ACE può essere metabolizzata in angiotensina III da un'aminopeptidasi con proprietà vasocostrittrici.

In conclusione l'effetto dell'angiotensina I è ambivalente: da un lato, attraverso l'angiotensina II e il suo prodotto angiotensina III, ha un'attività vasocostrittrice, dall'altro, attraverso l'angiotensina 1-7, possiede un'attività opposta.

Questa duplice funzione ha il fine evidente di moderare l'attività vasocostrittrice che nel sistema renina-angiotensina-aldosterone ha il compito di garantire livelli ottimali della pressione arteriosa.

Il segnale a lungo termine dell'angiotensina II, lo stress ossidativo e lo stato infiammatorio correlato sono dei meccanismi che intervengono direttamente nell'instaurarsi e nell'evolversi del processo di rimodellamento cardiovascolare che sfocia poi in aterosclerosi e danno d'organo.

Anche se negli ultimi anni molte informazioni ci sono giunte da studi sulla traduzione del segnale dell'angiotensina II alle cellule, i processi biochimici che mediano le anomalie nel segnale cellulare nell'ipertensione continuano a rimanere poco chiari. Indagare, quindi, sui meccanismi che regolano questi processi a livello cellulare, molecolare e genetico potrebbe fornirci maggiori informazioni sul meccanismo d'azione dei farmaci in uso e su possibili terapie innovative.

4. Enzima di conversione dell'angiotensina (ACE)

L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) è l'elemento chiave del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS).

Essa gioca un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi del flusso vascolare, regolando sia la produzione del vasocostrittore angiotensina II dall'angiotensina I, sia inattivando ormoni vasodilatatori quali la bradichinina [33-48-49-50] (Fig. 8).

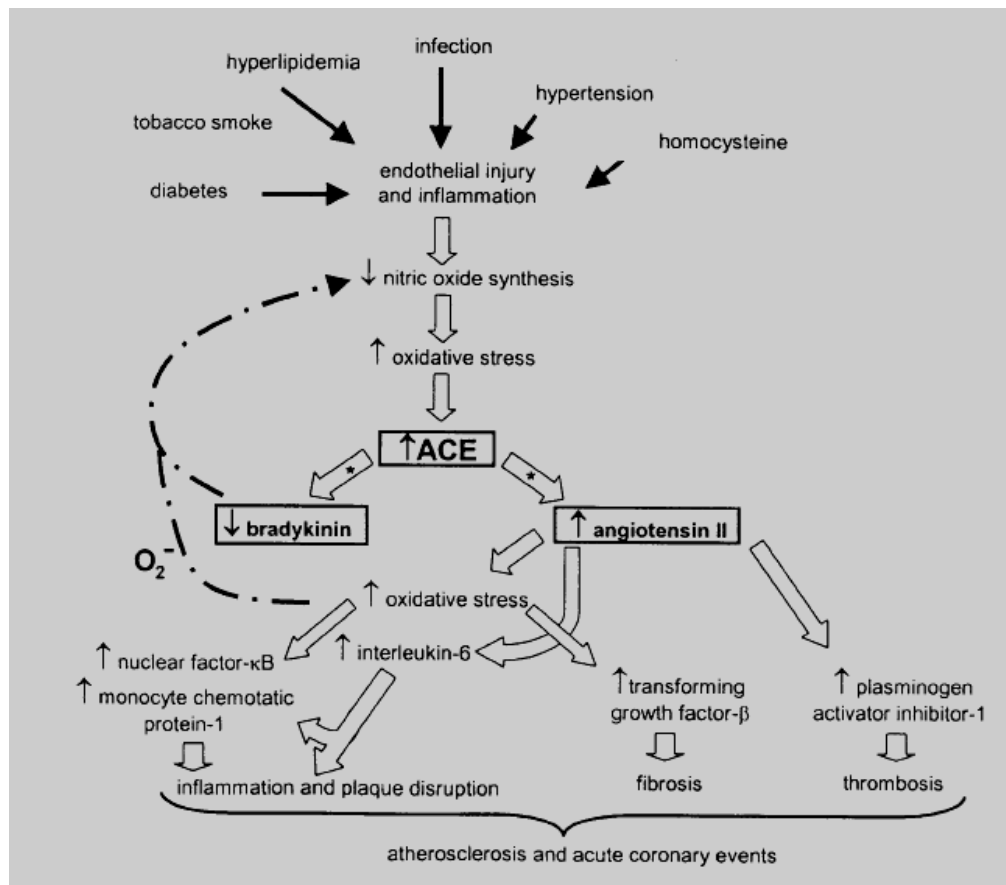


Figura 8. Azioni dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE).

Un suo aumento può derivare dalla presenza di diverse patologie quali il diabete e l'ipertensione o da altri fattori (Fig. 8), determinando un innalzamento dell'angiotensina II ed un decremento della bradichinina con effetti pro eventi coronarici acuti.

4.1 Gene ACE

Il gene ACE, lungo 21 kb, si trova sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q23) ed è costituito da 26 esoni e 25 introni [34-35-52] (Fig. 9).

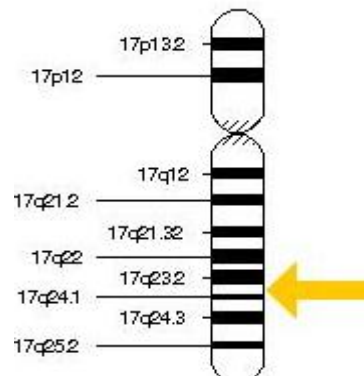


Figura 9. Localizzazione del gene ACE

Diversi studi hanno dimostrato che il prodotto del gene ACE conferisce suscettibilità alle malattie cardiovascolari [50-53-54].

Il gene codifica per 2 isoforme: la forma somatica (sACE) con una massa molecolare di 170 kDa espressa nel tessuto somatico e la forma testicolare (tACE) di 100 kDa sintetizzata nelle cellule germinali e nei testicoli.

Le due isoforme derivano da una trascrizione a partire da due differenti promotori. L'ACE somatico è trascritto da un promotore localizzato al 5' del primo esone (Spro) e guida la trascrizione di tutti gli esoni. La forma germinale è trascritta a partire da uno specifico promotore interno, un frammento di 91 bp nell'introne 12 (Gpro).

Le due forme differiscono in quanto l'sACE ha due siti attivi (N e C terminali) mentre la forma tACE ha un singolo sito attivo analogo alla porzione C-terminale della forma

sACE. La funzione della forma tACE non è nota, ma sembra essere coinvolta nella riproduzione maschile [35].

4.2 Proteina ACE

L'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) è una zinco metallo peptidasi, localizzata prevalentemente nelle cellule endoteliali dei capillari, nelle cellule di assorbimento epiteliale (del tubulo renale prossimale) e in altri epiteli compresi quelli del tessuto cerebrale [34-51].

L'ACE converte l'inattivo decapeptide angiotensina I (o angiotensina 1-10) nell'attivo octapeptide e potente vasocostrittore angiotensina II (o angiotensina 1-8), che è la forma attiva nel sistema renina-angiotensina-aldosterone (Fig. 10).

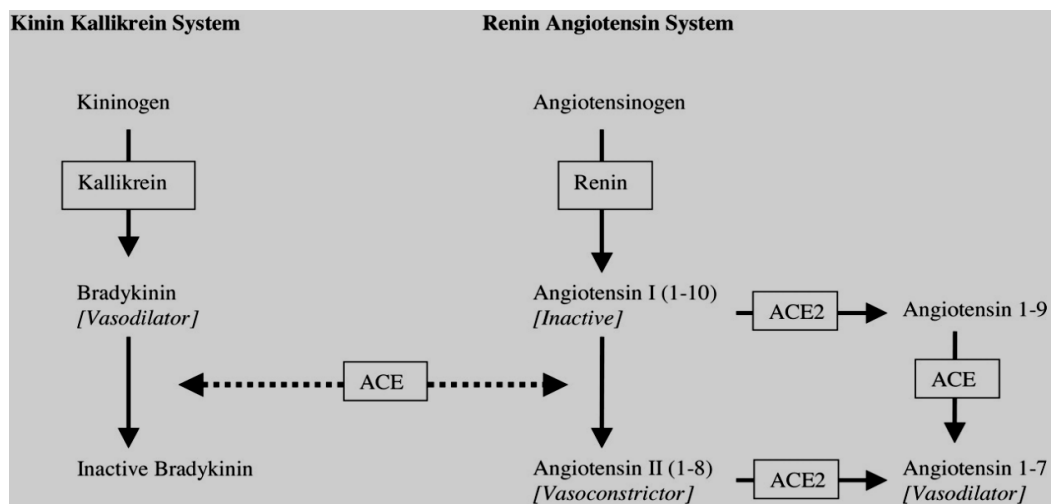


Figura 10. Meccanismi di azione e metabolismo dell'ACE.

La regolazione a lungo termine della pressione e del volume plasmatico nel corpo è sotto il controllo del sistema RAAS [35-51].

La renina, rilasciata dalle cellule iuxtaglomerulari per attivazione del sistema simpatico, converte l'angiotensinogeno (sintetizzato nel fegato) in angiotensina I (proteina vaso-inattiva). Successivamente l'angiotensina I viene convertita in angiotensina II dall'enzima ACE.

L'enzima di conversione dell'angiotensina gioca, inoltre, un ruolo importante in un altro sistema ormonale, la cascata chinina-kallikreina, metabolizzando la bradichinina, sostanza vasodilatatrice, in un metabolita inattivo, la bradichinina 1-5 (Fig. 10).

L'ACE, oltre ad essere coinvolto nell'eziopatogenesi delle patologie cardiovascolari, sembrerebbe ricoprire un ruolo nelle malattie neurologiche quali l'Alzheimer, il Parkinson, la depressione ed altri disordini affettivi. Si è visto, infatti, che l'enzima sarebbe in grado, in vitro, di degradare la beta-amiloide implicata nella patogenesi della malattia di Alzheimer [35].

4.3 Polimorfismo I/D del gene ACE

I livelli plasmatici di ACE presentano un'ampia variabilità inter-individuale e nel 1990 Rigat et al. identificarono un polimorfismo caratterizzato dalla presenza (inserzione, I) o dall'assenza (delezione, D) di una sequenza *Alu* di 287 bp nell'introne 16 del gene ACE [48] (Fig. 11).

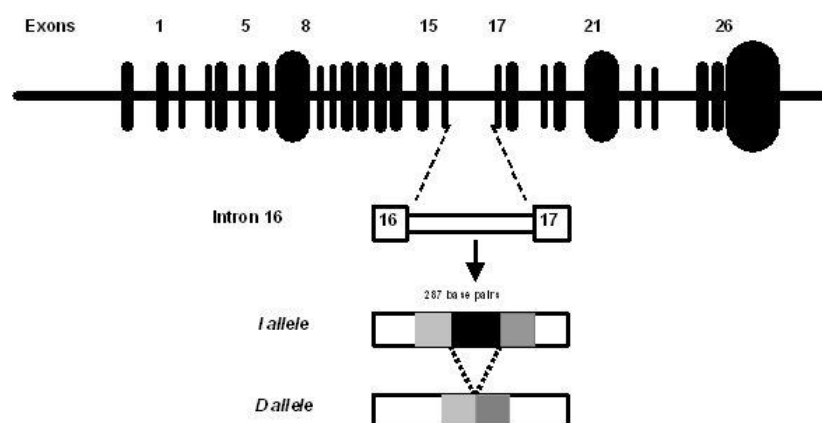


Figura 11. Diagramma e polimorfismo inserzione/delezione del gene ACE.

Dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio è possibile visualizzare un amplificato di 490 bp, in presenza dell'inserzione (allele I), e/o un frammento di 190 bp, in assenza dell'inserzione (allele D) [33-49-50].

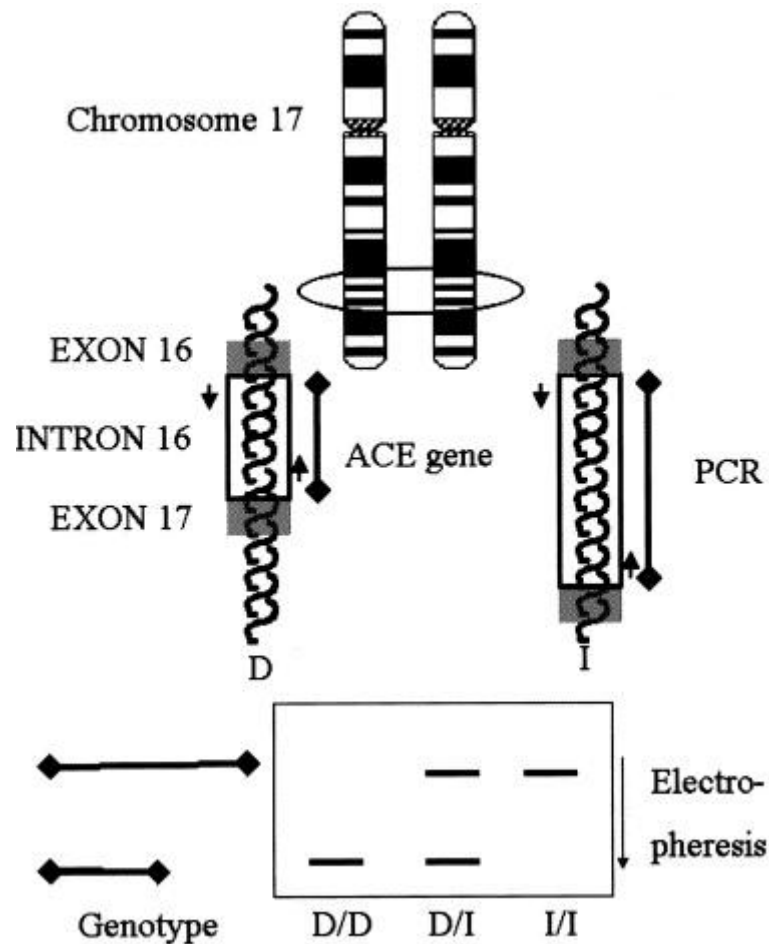


Figura 12. Metodologie di analisi del polimorfismo I/D del gene ACE.

Tale polimorfismo può, quindi, produrre tre diversi genotipi (Fig. 12-13):

- **I/I** (inserzione in omozigosi)
- **I/D** (eterozigosi per inserzione/delezione)
- **D/D** (delezione in omozigosi)

E' ormai noto in letteratura che l'attività enzimatica della proteina ACE nei soggetti con genotipo D/D è approssimativamente il doppio rispetto ai soggetti con l'inserzione in omozigosi (I/I)[54].

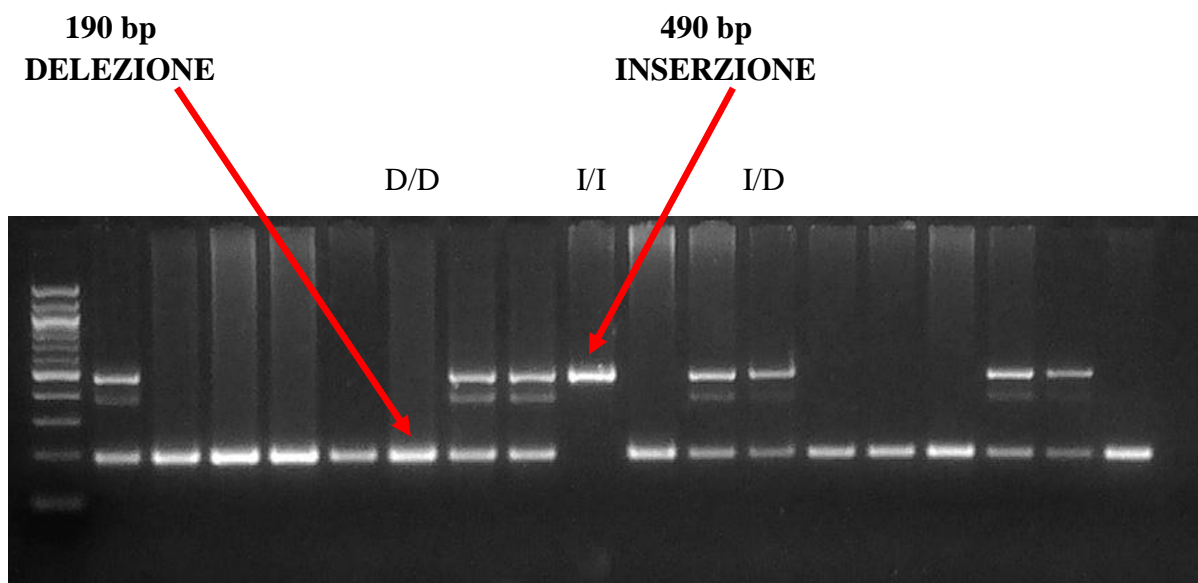


Figura 13. Pattern elettroforetico del polimorfismo I/D del gene ACE.

5. Protocollo sperimentale

5.1 Obiettivo dello studio

Diversi studi hanno messo in evidenza una possibile associazione tra ipertensione arteriosa e varianti alleliche di geni codificanti per proteine coinvolte nella patogenesi di malattie cardiovascolari.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare le frequenze genotipiche del polimorfismo Inserzione/Delezione (I/D) del gene Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in un gruppo di soggetti ipertesi ed un gruppo di soggetti normotesi, al fine di poter identificare una possibile correlazione tra patologia ipertensiva e il polimorfismo I/D del gene ACE.

5.2 Pazienti, materiali e metodi

Lo studio è stato condotto su 146 pazienti ipertesi (88 maschi, età media 51 anni) e su 172 soggetti normotesi (86 maschi, età media 33 anni).

L'ipertensione arteriosa è stata definita sulla base dei criteri delle ultime linee guida ESH/ESC(2013) [9]. Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e tutti i soggetti hanno fornito consenso informato per l'utilizzo dei campioni biologici.

Il polimorfismo dei singoli soggetti è stato tipizzato attraverso la tecnica di reazione a catena della polimerasi (PCR) e la discriminazione dei tre differenti genotipi I/I, I/D e D/D è stata eseguita tramite elettroforesi.

5.3 Estrazione del DNA

Per l'isolamento del DNA a partire da sangue intero è stato usato il kit della Roche, High Pure PCR Template Preparation Kit. Il procedimento di estrazione prevede due fasi:

Lisi del campione: A partire dal campione si prelevano 200 µl di sangue e si trasferiscono in un tubo da microcentrifuga sterile di 1.5 ml. Si aggiungono 200 µl di Binding Buffer [6 M guanidinium-HCL, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCL, 20% Triton X-100 (v-v), pH 4.4 (+25°C)], precedentemente riscaldato a 70°C, 40 µl di Proteinasi K per lisare il campione e inattivare le DNasi endogene. Dopo agitazione del campione per inversione si procede all'incubazione del campione a 70°C per 10'. Successivamente si aggiungono 100 µl di isopropanolo e si agita bene. Si inserisce uno degli High Filter Tube (tubo in polipropilene con strati di fibre di vetro) in un Collection Tube. Si assembla l'intero High Pure Filter Tube e si centrifuga a 8.000 x g per 1'.

Lavaggio ed eluizione: Dopo la centrifugazione si rimuove il Filter Tube dal Collection Tube, si elimina l'eluato e il Collection Tube. Si inserisce il Filter Tube in un nuovo Collection Tube e si procede ai lavaggi del campione. Si aggiungono 500 µl di Wash Buffer [20 mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7.5 (+25°C)] nella parte superiore del Filter Tube. Si centrifuga a 8.000 x g per 1'. Il lavaggio si ripete per due volte; al termine di ciascun lavaggio si sostituisce il Collection Tube. Successivamente si centrifuga l'intero High Tube assemblato per 10" alla massima velocità per eliminare eventuali residui di Wash Buffer. Per eluire il DNA, si inserisce il Filter Tube in un tubo sterile da 1.5 ml e si aggiungono 200 µl di Elution Buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.5 (+25°C)], preriscaldato a 70°C, nella parte superiore del Filter Tube.

Si centrifuga a 8.000 x g per 1'. Nell'eluato avremo il DNA che potrà essere usato direttamente o conservato a +2/+8° C o a -15/-25°C per analisi successive.

5.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione di amplificazione è stata preparata in un volume finale di 50µl ed è stata effettuata secondo il seguente protocollo: 0.2-1µg DNA template; buffer 1X; dNTP 0,5 mM; primers 0.5 µM; MgCl₂ 3 mM; Taq 1 U. Le amplificazioni sono state effettuate sul Termociclature Perkin Elmer 9600, utilizzando le coppie di primers e le condizioni di amplificazione di seguito riportate. La ricerca del polimorfismo inserzione/delezione (I/D) del gene ACE prevede l'amplificazione, tramite PCR, di un frammento di 490 bp in presenza dell'inserzione (allele I) e di 190 bp in assenza dell'inserzione (allele D), utilizzando le seguenti sequenze oligonucleotidiche specifiche:

5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTT -3'

5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT -3'

Condizioni di amplificazione :

Fase 1: Temperatura: 94°C; Tempo: 3 minuti (“initial melting o hot start”);

Fase 2: Temperatura: 94°C; Tempo: 1 minuto (“melting”);

Fase 3: Temperatura: 58°C; Tempo: 1 minuto (“annealing”);

Fase 4: Temperatura: 72°C; Tempo: 2 minuti (“extension”);

Fase 5: Ripetizioni delle fasi 2-4 per 30 volte;

Fase 6: Temperatura 72°C; Tempo: 2 minuti (“last extension”);

Fase 7: Temperatura 4°C; Tempo: infinito (“soak file”).

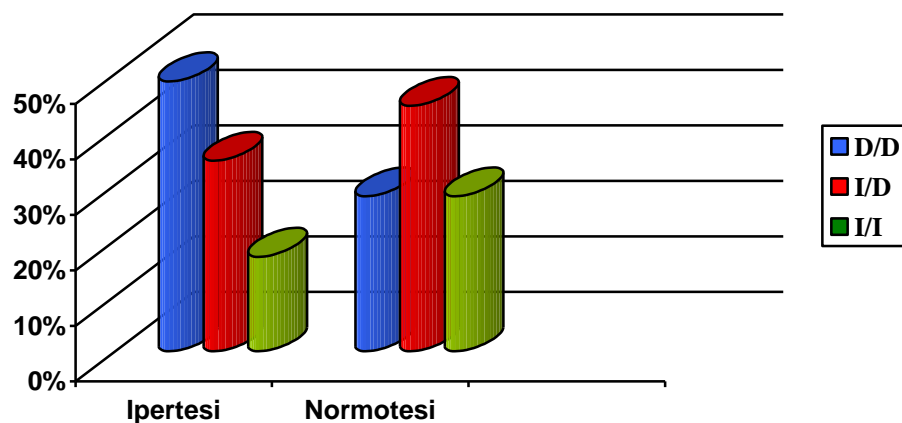
I prodotti dell'amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% per 20 minuti a 120 V .

6. Risultati e discussione

Diversi studi hanno riportato un'associazione tra l'allele D del polimorfismo I/D del gene ACE ed i livelli plasmatici dell'enzima ACE, nonché della sua correlazione con la patologia ipertensiva [50-51-53].

E' in questo contesto che si inserisce la mia analisi.

La tabella 3 riporta le frequenze dei tre genotipi (D/D, I/D, I/I) ottenute nei due gruppi presi in esame. Su un totale di 146 soggetti ipertesi il 48.6% possiede genotipo D/D, 34.3 % I/D e il 17.1 % I/I. Il 27.9 % dei soggetti normotesi è risultato D/D, il 44.2 % I/D ed il 27.9 % I/I (Grafico e Tabella 3).






Genotipo	Soggetti Ipertesi (n. 146)	Soggetti Normotesi (n. 172)
 D/D	71 (48.6%)	48 (27.9%)
 I/D	50 (34.3%)	76 (44.2%)
 I/I	25 (17.1%)	48 (27.9%)

Tabella 3. Frequenze genotipiche del polimorfismo I/D del gene ACE.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite l'applicazione del test chi-quadro. Dall'analisi dei nostri dati è emerso che il gruppo dei soggetti ipertesi presenta una frequenza genotipica D/D maggiore e una minore frequenza del genotipo I/I rispetto ai normotesi con un $P < 0.001$.

Questa prima osservazione, in accordo con alcuni dati di letteratura, ci permette di ipotizzare che il genotipo D/D del polimorfismo I/D del gene ACE sia effettivamente associato alla patologia ipertensiva.

La Tabella 4 mostra i dati del confronto delle frequenze alleliche anch'esso effettuato con il test del chi-quadro. I dati sono in linea con quelli ottenuti dal confronto dei genotipi. Infatti, le distribuzioni alleliche tra soggetti ipertesi e normotesi risultano significativamente diverse (maggior frequenza dell'allele D tra gli ipertesi) con un $P < 0.001$.

Allele	Soggetti Ipertesi (n. 292)	Soggetti Normotesi (n. 344)
D	65.8%	50%
I	34.2%	50%

Tabella 4. Frequenze alleliche del polimorfismo I/D del gene ACE.

Il nostro studio indica che i soggetti ipertesi hanno una maggior frequenza dell'allele D (e del genotipo omozigote D/D) del polimorfismo I/D del gene dell'ACE rispetto ai

normotesi; dobbiamo ricordare tuttavia che l'ipertensione è una malattia poligenica e multifattoriale in cui diversi geni sono coinvolti nella sua eziopatogenesi.

Inoltre, l'alterazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, coinvolto nella regolazione della pressione arteriosa, può giocare un ruolo importante nello sviluppo della malattia ipertensiva. Essendo tale sistema composto da più elementi, bisogna tener conto del coinvolgimento dei polimorfismi che interessano altri geni implicati nella regolazione dello stesso.

I lavori in letteratura riportano dati contrastanti circa l'associazione del polimorfismo I/D del gene ACE e l'ipertensione. Bedir et al. hanno evidenziato un'associazione tra allele D e la patologia ipertensiva [55]. Studi sulla popolazione Caucasica non hanno supportato la relazione tra polimorfismo I/D del gene ACE e ipertensione, mentre Duru et al. hanno osservato una maggiore frequenza dell'allele D negli Afro-Americani ipertesi [56]. Dati diversi derivano dallo studio di Companioni et al. in cui non si evidenziava alcuna associazione tra allele D ed ipertensione in pazienti cubani [57].

Ciò sottolinea l'importanza dell'origine etnica della popolazione studiata, suggerendo una differente distribuzione allelica e quindi un differente peso come fattore di rischio per le patologie cardiovascolari nelle popolazioni prese in esame. Diversi lavori, inoltre, hanno evidenziato un'associazione diretta tra i livelli plasmatici dell'ACE e i polimorfismi genetici supportando l'ipotesi di una maggiore espressione dell'enzima nei soggetti portatori del genotipo D/D.

Ueda et al. hanno confermato tale ipotesi trattando soggetti normotesi con dosi crescenti di angiotensina I attraverso iniezioni intravenose. I risultati hanno evidenziato un aumento a livello plasmatico dell'angiotensina II ed un innalzamento della pressione sanguigna; tali aumenti si riscontrarono più elevati in soggetti con genotipo D/D rispetto a soggetti che presentavano il genotipo I/I [58].

A supporto di questa ipotesi altri lavori scientifici hanno rivelato una relazione diretta tra i livelli plasmatici dell'ACE ed il genotipo relativo [50-53].

Infatti sono stati evidenziati livelli sierici differenti dell'enzima ACE nei tre genotipi (I/I, D/D, I/D). Soggetti con il genotipo D/D presentavano valori più elevati di ACE sierico rispetto a quelli con genotipo inserzione/inserzione (I/I), mentre livelli intermedi sono stati riscontrati negli eterozigoti a sostegno della codominanza allelica [35-48-59].

Numerosi studi, inoltre, hanno valutato l'associazione tra il polimorfismo I/D del gene ACE e l'aterosclerosi riportando una correlazione positiva con l'allele D [33-51-53].

Tale associazione risulta essere più forte in un gruppo di soggetti ad alto rischio in quanto affetti da diabete, ipertensione, etc. [35]. Tali evidenze hanno favorito l'ipotesi che il polimorfismo I/D del gene ACE sia coinvolto nella malattia ipertensiva attraverso i sistemi renina-angiotensina-aldosterone e chinina-kallicreina [35].

Sulla base di tali studi è opportuno valutare nuove strategie terapeutiche per il trattamento della malattia cardiovascolare.

Una di queste vedrebbe l'ACE tissutale come importante target terapeutico. Esso svolge, infatti, molteplici funzioni: la sua inibizione non solo riduce l'angiotensina II, lo stress ossidativo e lo stato infiammatorio (indotto dall'angiotensina II), ma incrementa la formazione di bradichinina che possiede effetti antinfiammatori, antitrombotici e vasorilassanti.

Studi condotti su pazienti affetti da patologia cardiovascolare hanno evidenziato che l'inibizione dell'ACE tissutale può efficacemente ridurre il rischio di morte prematura, infarto del miocardio e stroke [20].

A tale proposito, lo studio genetico nei soggetti con familiarità per la malattia cardiovascolare e nei quali sussistono ulteriori fattori di rischio può avvalersi di strategie terapeutiche specifiche.

Nonostante la notevole efficacia dei farmaci oggi disponibili, il controllo della pressione arteriosa, nei paesi occidentali, rimane largamente insoddisfacente ed è per tale motivo che l'indagine genetica è un importante metodo per valutare, non solo il rischio di manifestare la patologia ipertensiva, ma di individuare il trattamento specifico per ogni singolo soggetto. Nella pratica, tuttavia, non va sottovalutato che semplici modifiche dello stile di vita possono dare significativi risultati sul mantenimento dell'omeostasi pressoria. In quest'ottica, i risultati di questa tesi potrebbero essere confermati ampliando il numero di soggetti da sottoporre a screening genetico. Dopo opportuna terapia farmacologica con ACE-inibitori, andrebbe, inoltre, valutato e, quindi confermato, il decremento plasmatico dell'enzima stesso in associazione con la riduzione del rischio di sviluppare le complicanze della malattia ipertensiva.

Sebbene il polimorfismo I/D del gene ACE sia stato ampiamente studiato in relazione alla patologia cardiovascolare e ad altri fenotipi complessi, la sua localizzazione in una regione intronica non codificante rende improbabile un suo ruolo funzionale.

Esso probabilmente si trova in linkage disequilibrium con il vero polimorfismo funzionale, detto QTL (quantitative trait loci), responsabile dei livelli plasmatici di ACE [35]. Ulteriori studi dovranno approfondire il ruolo e l'importanza del polimorfismo I/D del gene ACE come marker genetico nella malattia ipertensiva, valutando anche altre varianti genetiche associate allo sviluppo di patologie cardiovascolari.

Bibliografia:

1. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
2. Hsieh MC, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, Tsai JH. Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in Taiwan. *Nephrol. Dial Transplant.* 2000 Jul;15:1008-13.
3. Tiret L, Blanc H, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, et al. Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a moderee Essentielle. J Hypertens.* 1998 Jan;16:37-44.
4. Pujia A, Gnasso A, Irace C, Dominijanni A, Zingone A, Perrotti N, Colonna A, Mattioli PL. Association between ACE-D/D polymorphism and hypertension in type II diabetic subjects. *J Hum. Hypertens.* 1994 Sep;8:687-91.
5. Ahluwalia TS, Ahuja M, Rai TS, Kohli HS, Bhansali A, Sud K, Khullar M. ACE Variants Interact with the RAS Pathway to Confer Risk and Protection against Type 2 Diabetic Nephropathy. *DNA Cell Biol.* 2009 Mar;28:141-50.
6. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature.* 1992 Oct 15;359(6396):588-9.
7. Chen Y, Dong S, He M, Qi T, Zhu W. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and risk of myocardial infarction in an updated meta-analysis based on 34993 participants. *Gene.* 2013 Jun 15;522(2):196-205.

8. Lee YJ, Tsai JC. ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with 1998 World Health Organization definition of metabolic syndrome in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002 Jun;25(6):1002-8. 42.
9. Mancia G. et al. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens*. 2013 Oct;31(10):1925-38.
10. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
11. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217–23.
12. Causes of Death 2008 [online database]. Geneva, World Health Organization.
13. Volpe M, Tocci G. 2007 ESH/ESC Guidelines for the management of hypertension, from theory to practice: global cardiovascular risk concept. *J. Hypertens*. 2009. 27 Suppl 3: S3-11.
14. La Brocca A., Orso Giaccone G., Zanella D.. Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio. 2004. *Caleidoscopio* n° 185.
15. Rugarli C.. *Medicina interna sistematica*. Masson; Quinta edizione, 2005; 1(1):11.
16. Nickenig G., T. Bäumer A., Temur Y., Kebben D., Jockenhövel F. and Böhm M.. Statin-Sensitive Dysregulated AT1 Receptor Function and Density in Hypercholesterolemic Men. *Circulation* 1999;100;2131-2134.
17. Cai H. and Harrison D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ. Res*. 2000;87;840-844.
18. Wilcox CS. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr Hypertens Rep*. 2002 Apr;4(2):160-6.

19. Johns DG, Dorrance AM, Leite R, Weber DS, Webb RC. Novel signaling pathways contributing to vascular changes in hypertension. *J Biomed Sci.* 2000;7(6):431-43.
20. Dzau V.J.. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease : A Unifying Hypothesis. *Hypertension* 2001;37;1047-1052.
21. Cooper S. A., Whaley-Connell A., Habibi J., Wei Y., Lastra G., Manrique CStas., S., and Sowers J.R.. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2007; 293: H2009–H2023.
22. Cannon III R. O., Potential Mechanisms for the Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Endothelial Dysfunction: The Role of Nitric Oxide. *The american journal of cardiology.* 1998; vol. 82 (10a); 8s-10s.
23. Davignon J. and Ganz P.r. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 2004;109; III-27-III-32.
24. Levi M., van der Poll T., Büller H. R.. Bidirectional Relation Between Inflammation and Coagulation *Circulation.* 2004;109;2698-2704.
25. Levy B. I.. Beneficial Effects of Circulating Progenitor Endothelial Cells Activated by Angiotensin Receptor Antagonists. *Hypertension* 2005;45;491-492.
26. Palatresi, Bencini C., Del Vecchio C., Mansueto G., Arosio E., Tommasoli R., Seta F., Capone M. L., Tacconelli S., Minuz P., Patrignani P., Gaino S., Degan M., Menapace L., Lechi Santonastaso C., Lechi A., Morganti A. and Patrono C.. Increased oxidative Stress and Platelet Activation in Patients With Hypertension and Renovascular Disease. *Circulation* 2002;106;2800-2805.
27. Dzau V.J.. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease : A Unifying Hypothesis. *Hypertension* 2001;37;1047-1052.

28. Halkin A., Keren G., Potential Indications for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Atherosclerotic Vascular Disease. *The American Journal of Medicine.* 2002; 112; 126-134.
29. Ramesh K.v., Ashok Shenoy K.. Endothelial dysfunction: many ways to correct-trends that promise. *indian journal of pharmacology* 2003; 35; 73-82.
30. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Arzilli F, Salvetti A. Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:S193-S195.
31. Eisenmann J. C, Sarzynski M. A, Glenn K., Rothschild M., and Heelan K. A. ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. *Cardiovasc Diabetol.* 2009; 8:14.
32. Volpe M., Tocci G., Pagannone E.. L'attivazione del sistema renina-angiotensina aldosterone nello scompenso cardiaco. *Ital Heart J* 2005; 6 (Suppl 1): 16S-23S.
33. Huang M., Gai X., Yang X., Hou J., Lan X., Zheng W., Chen F. and He J.. Functional polymorphisms in ACE and CYP11B2 genes and atrial fibrillation in patients with hypertensive heart disease. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(1):32–37.
34. Griendling KK, Murphy TJ and Alexander RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1993;87: 1816-1828.
35. Sayed-Tabatabaei F.A., Oostra B.A., Isaacs A., van Duijn C.M., Witteman J.C.M.. ACE Polymorphisms. *Circulation Research.* 2006; 98:1123.
36. Yamazaki T, Yazaki Y. Role of tissue angiotensin II in myocardial remodelling induced by mechanical stress.*J Hum Hypertens.* 1999 Jan;13 Suppl 1:S43-7;
37. Cassis LA, Lynch KR, Peach MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ. Res* 1988a;62:1259–1262.

38. Saye JA, Cassis LA, Sturgill TW, Lynch KR, Peach MJ. Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am. J. Physiol* 1989;256:C448–C451.
39. Cassis LA. Fat cell metabolism: insulin, fatty acids, and renin. *Curr. Hypertens. Rep* 2000;2:132–138.
40. Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2007;292:R274–R282.
41. Galvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, de Las Heras AI, Merino B, Arribas S, Ruiz-Gayo M, Huber M, Wehland M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J. Endocrinol* 2008;197:55–64.
42. Frigolet ME, Torres N, Tovar AR. The renin-angiotensin system in adipose tissue and its metabolic consequences during obesity. *J Nutr Biochem*. 2013 Dec;24(12):2003-15.
43. Skultetyova D, Filipova S, Riecanaky I, Skultety J. The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*. 2007 ;2(1):23-7.
44. Li D., M.Singh R., Liu L., Chen H., Singh B. M., Kazzaz N., Mehta J.L.. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiov. Research* .2003; 238-243.
45. Singh B. M., Mehta J. L.. Interactions Between the Renin-Angiotensin System and Dyslipidemia. Relevance in the Therapy of Hypertension and Coronary Heart Disease. *Arch Intern Med*. 2003;163:1296-1304.

46. Yusuf S., Sleight P., Pogue J., Bosch J., Davies R., Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in highrisk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 145-153.
47. Harmer D., Gilbert M., Borman R., K. L. Clark. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Letters* 2002; 532: 107-110.
48. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest.* 1990 Oct;86(4):1343-6.
49. Matsuda T., Suzuki J., Furuya K., Masutani M., and Kawakami Y., Serum Angiotensin I-Converting Enzyme Is Reduced in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Irrespective of Genotype. *The american journal of gastroenterology.* 2001; 96: 2705-2710.
50. McNamara D. M., Holubkov R., Postava L, Janosko K., MacGowan G. A., Mathier M., Murali S., Feldman A. M., London B., Pharmacogenetic Interactions Between Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Therapy and the Angiotensin-Converting Enzyme Deletion Polymorphism in Patients With Congestive Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44: 2019-2026.
51. Dikmen M., Veysi Günes H., Degirmenci I., Ozdemir G., Basaran A. Are the angiotensin-converting enzyme gene and activity risk factors for stroke? *Arq neuropsiquiatr* 2006;64(2-a):211-216.
52. Zhu X., Bouzekri N., Southam L., Cooper R. S., Adeyemo A., McKenzie C. A., Luke A., Chen G., Elston R. C., and Ward R.. Linkage and Association Analysis of

- Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)–Gene Polymorphisms with ACE Concentration and Blood Pressure. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(5): 1139–1148.
53. Sim M. K. and Qui X. S.. Angiotensins in plasma of hypertensive rats and human. Elsevier Science B.V. 2003; 111: 179-182.
54. Seckin D, Ilhan N, Ilhan N, Ozbay Y, Bo M, Massaia M, Raspo S et al. The relationship between ACE insertion/deletion polymorphism and coronary artery disease with or without myocardial infarction. *Clin Biochem.* 2006 Jan;39(1):50-4.
55. Bedir A., Arik N., Adam B., Kiliç K., Gümüş T., and Guner E.. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and activity in Turkish patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1999; 12:1038-1043.
56. Duru K, Farrow S, Wang JM, Lockette W, Kurtz T. Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens.* 1994;7(8):759-62.
57. Companioni Nápoles O, Sautié Castellanos M, Leal L, Casavilla R, Camacho H, Ferrer A, Cintado A, Villareal A, Benítez JV, Nazabal M, Velasco JG, Cabalé B, Novoa LI, Dueñas M. ACE I/D polymorphism study in a Cuban hypertensive population. *Clin Chim Acta.* 2007 Mar;378(1-2):112-6.
58. Ueda S.; Elliott H. L.; Morton J. J.; Connell J. M. C.. Enhanced Pressor Response to Angiotensin I in Normotensive Men With the Deletion Genotype (DD) for Angiotensin-Converting Enzyme. *Hypertension.* 1995;25:1266-1269.
59. Hsiang-Tai Chou, Yng-Tay Chen, Yi-Ru Shi, and Fuu-Jen Tsai, Taichung, Taiwan. Association between angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and mitral valve prolapse syndrome. *Am Heart J* 2003; 145: 169-73.