



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO BIOMEDICO DI MEDICINA INTERNA E SPECIALISTICA

**Dottorato di Ricerca in "Genetica e fisiopatologia del danno
cardiovascolare nelle malattie endocrino-metaboliche"**

Coordinatore: Prof. Giuseppe Licata

XXII Ciclo- SSD MED/09

**POLIMORFISMI DEL TRASFORMING GROWTH FACTOR
 β 1, OBESITA' E DANNO CARDIOVASCOLARE**

Tesi di Dottorato della

Dott.ssa Maria Cristina Fiore

Tutor

Ch.mo Prof. Giuseppe Licata

AA 2008/2011

INTRODUZIONE

L'Obesità rappresenta una condizione clinica complessa, a genesi multifattoriale, ampiamente diffusa ed in crescente aumento soprattutto nei paesi industrializzati. L'eccessivo apporto calorico e la riduzione dell'attività fisica conseguente ad un'attività lavorativa di tipo sedentario, infatti, sono ormai divenuti, soprattutto nelle popolazioni occidentali industrializzate, comportamenti abituali e, per diverse ragioni, difficilmente modificabili, tanto che l'obesità, che inevitabilmente ne consegue, è stata definita, da alcuni autori, una "epidemia globale". L'associazione obesità-ipertensione è stata ampiamente documentata da numerosi studi epidemiologici e clinici e, a tal proposito, particolare interesse rivestono alcune caratteristiche proprie dell'obesità quali il grado, determinato dall'analisi del body mass index (BMI), il tipo di distribuzione adiposa, valutato tramite il rapporto circonferenza vita/fianchi (Waist/Hip Ratio-WHR) e la durata dell'eccesso ponderale.

La distribuzione del grasso di tipo centrale, in accordo con la Consensus Conference Italiana sull'obesità, caratterizzata da un valore $\geq 0,82$ nelle donne e $\geq 0,91$ negli uomini, si associa ad una più elevata prevalenza di complicanze cardiovascolari (ipertensione, cardiopatia ischemica e scompenso cardiaco), metaboliche (diabete e/o intolleranza agli idrati di carbonio, dislipidemie, iperuricemie) e sistemiche (artrosi, neoplasia del colon, insufficienza respiratoria, colelitiasi). L'obesità di tipo centrale

odiernamente viene considerata un vero e proprio fattore di rischio cardiovascolare maggiore.

Tra i principali meccanismi fisiopatologici responsabili del danno cardiovascolare nell'obesità bisogna ricordare:

- gli adattamenti emodinamici propri dell'obesità (elevati volumi intravascolari e cardiaci, elevati valori di portata cardiaca, resistenze vascolari inadeguate)
- l'iperattività del sistema nervoso simpatico
- l'iperinsulinismo e/o l'insulino resistenza
- l'azione della leptina
- le alterazioni dei meccanismi ormonali deputati al controllo del bilancio sodico

Per quel che riguarda quest'ultimo meccanismo fisiopatologico è stata dimostrata una ritardata e/o deficitaria soppressione dell'attività reninica e dell'aldosterone ed un mancato incremento dell'ANP, dopo carico salino acuto, sia in animali resi obesi, sia in giovani con obesità centrale esenti da maggiori fattori di rischio cardiovascolare. Ciò a conferma del fatto che tali soggetti non sono in grado, verosimilmente anche per l'intervento di fattori genetici, di regolare il proprio bilancio salino.

Oltre a tali fattori, numerosi studi hanno odiernamente suggerito che la leptina, prodotto specifico dell'adipocita coinvolto nella patogenesi

dell'obesità, possa assumere anche un ruolo rilevante nella fisiopatologia dell'ipertensione associata all'obesità.

Studi recenti hanno dimostrato che elevati livelli di leptina possono essere documentabili in soggetti con ipertensione arteriosa essenziale e che essi correlano con l'ispessimento della parete miocardica, soprattutto negli ipertesi con insulino-resistenza . Inoltre alcuni dati della letteratura attualmente in nostro possesso permettono di evidenziare i rapporti tra leptina e TGF- β_1 ed, in particolare, l'esistenza di: 1) una correlazione tra leptina e TGF- β_1 ; 2) azione di stimolo della leptina sull'espressione del TGF- β_1 nelle cellule endoteliali glomerulari renali in vitro e in vivo ; 3) azione di stimolo della leptina sull'espressione del recettore tipo II del TGF- β_1 nelle cellule mesangiali . Ulteriori dati indicano che il TGF- β_1 stimola l'espressione del gene "ob", suggerendo una possibile relazione in vivo tra le citochine infiammatorie e l'induzione del gene "ob" .

MODIFICAZIONI DELLA GEOMETRIA E DELLA FUNZIONE VENTRICOLARE SINISTRA NELL'OBESITA'

L'Obesità è caratterizzata da tutta una serie di adattamenti cardiovascolari consistenti in un aumento dei volumi circolanti e della portata cardiaca proporzionali all'eccesso ponderale. L'aumento della portata cardiaca, tipico dell'obeso, si manifesta precocemente a causa del

necessario incremento del flusso ematico per l'eccesso di tessuto adiposo. La frequenza cardiaca a riposo è di solito lievemente aumentata, mentre la gittata cardiaca è francamente aumentata. Le curve o gli indici di funzione sistolica, quali l'indice di carico di lavoro sulla pressione telediastolica del ventricolo sinistro o il rapporto tra il tempo di pre-eiezione ed il tempo d'eiezione, possono essere precocemente ridotti nei pazienti obesi . Esistono alcuni dati indicativi dell'esistenza di una disfunzione ventricolare sinistra preclinica, caratterizzata da una riduzione della frazione d'eiezione ventricolare sinistra sia a riposo sia dopo sforzo, soprattutto nei soggetti con obesità di lunga durata e con distribuzione del grasso di tipo centrale. A tali alterazioni possono associarsi modificazioni precoci della funzione diastolica ventricolare sinistra consistenti soprattutto in un incremento del tempo di rilasciamento isovolumetrico. Tali alterazioni possono essere osservate in assenza di disfunzione sistolica e sono espressione d'alterato rilasciamento e/o compliance ventricolare sinistra, spesso conseguenti all'ipertrofia ventricolare sinistra documentabile più o meno precocemente negli obesi. Si tratta per lo più di un'ipertrofia eccentrica caratterizzata da dilatazione della camera ventricolare sinistra con spessori parietali normali o solo lievemente aumentati.

Il meccanismo responsabile della frequente presenza dell'ipertrofia ventricolare sinistra negli obesi è da ricercare fondamentalmente nelle modificazioni del carico emodinamico sul ventricolo sinistro e nell'intervento

di diversi fattori di crescita quali, ad esempio, IGF-1 e TNF. Infatti, l'eccesso ponderale determina un incremento dei volumi circolanti con conseguente aumento della tensione diastolica della parete, replicazione in serie dei sarcomeri, allungamento dei miociti con dilatazione ed aumento della massa ventricolare sinistra. All'aumento della portata cardiaca, inoltre, non corrisponde una riduzione proporzionale delle resistenze periferiche con conseguente aumento dei valori di pressione arteriosa. E' stato dimostrato che la prevalenza dell'ipertrofia ventricolare sinistra si raddoppia quando all'eccesso ponderale si associa l'ipertensione arteriosa .

Tali modificazioni sono condizionate oltre che dal grado d'obesità, anche dalla sua durata. Infatti, nei soggetti con durata dell'obesità superiore a dieci anni, è possibile evidenziare un deficit significativo della frazione d'eiezione del ventricolo sinistro soprattutto sotto sforzo . Gli stessi soggetti sono caratterizzati da una riduzione della popolazione dei recettori adrenergici linfocitari, sia superficiali che totali, correlata al grado d'obesità e da una disregolazione degli ormoni deputati al controllo del bilancio sodico. Tali alterazioni, unitamente alla presenza dell'ipertrofia e alla frequente associazione con la cardiopatia ischemica, potrebbero essere responsabili, nell'obeso, tanto più se iperteso, della progressiva comparsa nel tempo di modificazioni franche della funzione ventricolare sinistra che, persistendo nel tempo, possono condurre allo scompenso cardiaco, prima latente e poi conclamato.

TRANSFORMING GROWTH FACTOR β 1 E DANNO

CARDIOVASCOLARE

Caratteristiche generali del TGF β 1

Il TGF β 1 è una citochina multifunzionale isolata dalla piastrine circa 25 anni or sono; nei mammiferi ne esistono tre isoforme (1,2,3) di cui la 1 è implicata nella risposta a lesioni tissutali ed è responsabile dei fenomeni di fibrosi. Esso è sintetizzato come una molecola precursore di 391 aminoacidi, clivato proteolicamente per produrre un frammento peptidico ed una subunità di 112 aminoacidi. La forma attiva di TGF β 1 è una proteina dimero di 25 kd composta da due subunità legate da un ponte disolfuro, secreto, in una forma inattiva o latente che richiede, prima di potere espletare il suo effetto biologico, l'attivazione (figura 2). Infatti il TGF β 1 è sintetizzato inizialmente come un grande precursore chiamato LAP (large latent protein).

Una peptidasi intracellulare è in grado di tagliare la regione C-terminale di LAP generando il dominio maturo del TGF β 1 (25 kDa) ed un dominio di 70 kDa; quest'ultimo lega non covalentemente il dominio maturo del TGF β 1 per formare un complesso dimerico chiamato SLC (small latent complex).

Sempre nel versante intracellulare SLC lega, una proteina conosciuta come LTBP (Latent TGF Binding Protein) per formare un grande

complesso che rende la molecola inattiva (figura 3) sequestrandola nel versante extracellulare.

La regione N-terminale di LTBP (proteina della famiglia delle fibrilline) favorisce infatti l'interazione di tale complesso con la matrice extracellulare.

In questo modo il TGF β 1 neosintetizzato non può svolgere la sua azione e crea nel versante pericellulare delle "zone di concentrazione" utilizzabili in condizioni di richiesta .

L'attivazione della citochina dunque deve passare per l'eliminazione dell'LTBP in modo tale da rompere il legame con la matrice e determinare la forma secreta del TGF β 1. Le molecole capaci di realizzare questo meccanismo sono proteine quali plasmina ed MMP9 che compiono un taglio proteolitico a carico del legame cisteinico e trombospondina-1 che altera il folding di legame LTBP con TGF β 1. In questo modello, LTBP non serve soltanto al sequestro di TGF β 1, ma anche a garantire a quest'ultimo un corretto folding; sembra che tale interazione con la matrice extracellulare costituisca il primo passo verso la corretta attivazione e secrezione della citochina .



Fig 2 *struttura tridimensionale dell'omodimero di TGFβ1*

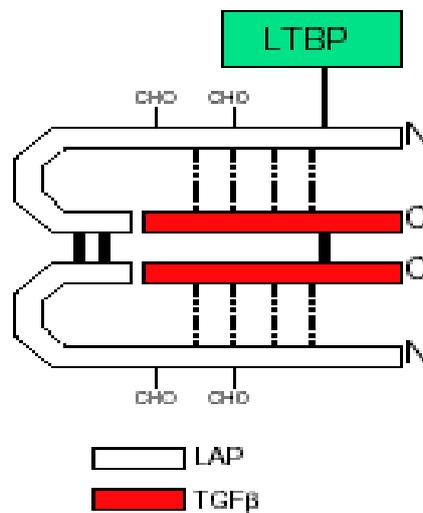


Fig 3 *Small latent complex (formato da due molecole di LAP e due domini attivi di TGFβ1) legato a LTBP*

Esistono tre tipi di recettori per il TGFβ: TβRI, TβRII e TβRIII, tutti coinvolti nel meccanismo di traduzione del segnale. Il tipo I, una serina-treonina-kinasi, media la sintesi e la produzione della matrice

extracellulare. Il recettore di tipo III lega TGF β 1 e lo presenta al recettore di tipo II. Questo legame simultaneo permette un cambiamento della chinasi intracellulare legata al recettore ed è la sua seguente autofosforilazione che rende il complesso biologicamente attivo. La forma attiva del recettore di tipo I è in grado di fosforilare le proteine della famiglia Smad. Le prime ad essere attivate sono Smad2/3 che si associano a Smad4 per formare un complesso etero-oligomero; questo trasloca nel nucleo e lega una sequenza specifica di DNA del promotore di geni di cui regola la trascrizione quali *c-jun*, *c-fos*, *E2F*. Il pathway di Smad può essere regolato negativamente da Smad 6 e Smad7; in particolare modo Smad 7 si lega ai recettori di tipo I impedendo la fosforilazione di Smad2/3 (figura 4).

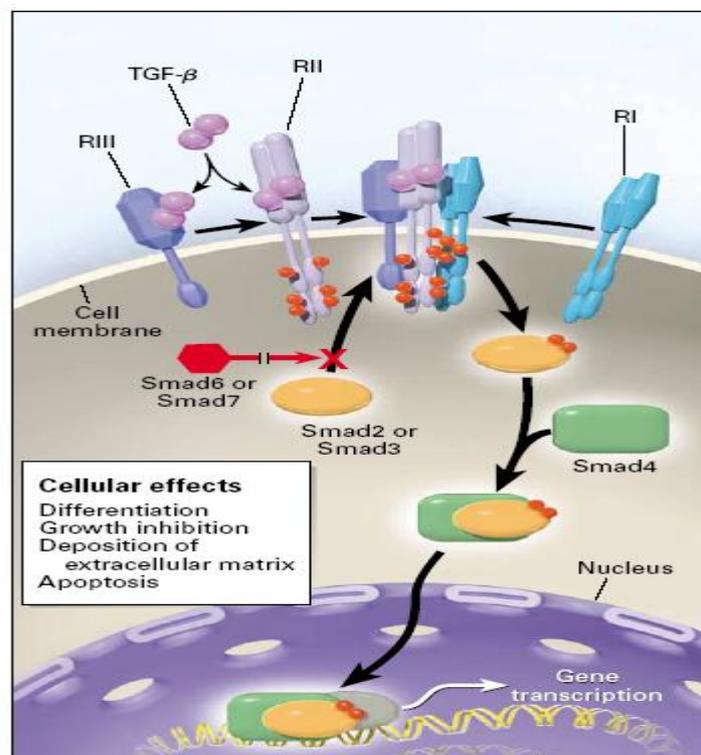


Fig 4 pathway di trasduzione del segnale del TGF β 1 dalla membrana al nucleo

A concentrazioni fisiologiche il TGF β 1 regola il platelet derived growth factor (nelle cellule muscolari lisce e nei fibroblasti), il fibroblast growth factor (nelle cellule endoteliali) ed il tumor necrosis factor e l'interleukina 1 (nei monociti) attraverso la stimolazione o l'inibizione della loro produzione, modulandone l'azione, sincronizzandone e controllandone i processi di riparazione. Inibisce inoltre la funzione delle cellule T e B e la loro produzione di tumor necrosis factor ed interleukina 1; inoltre modula la citotossicità dei macrofagi, attraverso la soppressione della produzione di superossido e ossido nitrico .

TGF β 1 ed Ipertensione

Da quanto emerge dalla mole di dati sperimentali ed in vivo, l'iperproduzione di TGF β 1 è coinvolta nello sviluppo del danno cardiaco dell'obesità quali l'ipertrofia ventricolare sinistra, il rimodellamento vascolare, la progressione del danno renale. Studi sperimentali hanno evidenziato come il TGF β 1 possa determinare un innalzamento dei valori di pressione arteriosa tramite la stimolazione dei livelli di RNA dell'endotelina-1 da parte dell'endotelio vascolare. Infatti il TGF β 1 stimola l'espressione dell'endotelina 1 ed inibisce la produzione di ossido nitrico nelle cellule endoteliali determinando un incremento dei valori di pressione arteriosa. Allo stesso tempo, come espresso precedentemente, tale citochina gioca un ruolo fondamentale insieme all'angiotensina II nel

determinare il danno renale determinando conseguentemente un innalzamento dei valori di pressione arteriosa. Infine promuovendo la deposizione di matrice extracellulare a livello cardiaco altera il rilasciamento aumentando la rigidità della camera cardiaca stessa.

TGFβ1 e danno renale

Anche se il TGFβ1 può funzionare sia come agonista che come antagonista della proliferazione cellulare e della infiammazione, esso induce la deposizione della matrice extracellulare. L'accumulo di matrice nei tessuti è la caratteristica principale delle malattie fibrotiche. La matrice extracellulare è una superstruttura dinamica di macromolecole self-aggregating, che include fibronectina, collagene e proteoglicani, alle quali le cellule si attaccano attraverso i recettori di superficie chiamate integrine. Il TGFβ1 determina la deposizione della matrice extracellulare attraverso la stimolazione delle cellule che incrementano la sintesi di matrice proteica e attraverso la diminuzione della produzione di proteasi che degradano la matrice. Questi effetti possono essere parte di un feedback negativo che normalmente regola l'espressione del TGFβ1. Quest'ultimo si lega ai proteoglicani nella matrice o vicino alle cellule di superficie, e questo legame può agire come segnale per interrompere la produzione di TGFβ1 dopo la riparazione tissutale .

Elevate concentrazioni di TGF β 1 sono di rilevante importanza nella glomerulosclerosi da nefropatia diabetica. Ratti resi diabetici con la streptozocina, un farmaco che causa un deficit di insulina presentano un aumento delle concentrazioni di TGF β 1mRNA e TGF β 1 nei glomeruli . Negli uomini un buon compenso della glicemia e/o la somministrazione di ACE inibitori ritarda lo sviluppo della nefropatia diabetica. Nelle cellule mesangiali di ratto l'incremento di glucosio insieme a quello di angiotensina II inducono l'aumento di TGF β 1 che stimola la sintesi di fibronectina, collagene e proteoglicani. In biopsie renali di pazienti con glomerulonefriti proliferative mesangiali la immunofissazione per TGF β 1 risulta essere intensa, e l'intensità è strettamente correlata con la quantità di matrice mesangiale . Nei glomeruli di pazienti con nefropatia diabetica il TGF β 1 e la produzione di matrice proteica indotta da esso era aumentata come quella riscontrata nei ratti. Infine recentemente elevate quantità di TGF β 1 sono state trovate nei reni fibrotici prelevati da pazienti con nefropatia da sindrome da immunodeficienza acquisita e pazienti con rigetto post-trapianto.

Polimorfismo del TGF β 1 ed obesità

L'ipotesi che l'obesità sia il risultato di una interazione tra i fattori genetici e fattori ambientali è un dato ormai assodato da molti anni così come nell'ultimo decennio si è consolidato come le più comuni malattie della società occidentali quali le malattie cardiovascolari, l'asma, il diabete ed i

tumori siano per esempio il risultato della interazione tra componente genetica e fattori ambientali. La scoperta delle variazioni alleliche e cioè dei polimorfismi genetici, ha recentemente modificato l'approccio degli studi alle patologie ereditarie, focalizzando l'attenzione sulla ricerca di regioni cromosomiche contenenti geni potenzialmente coinvolti nel processo di patogenesi e che variano con un certa frequenza. Viene infatti definito polimorfismo, una variazione allelica, per un determinato gene, riscontrata nella popolazione, con una percentuale superiore all'1%. I polimorfismi vengono suddivisi in polimorfismi per la lunghezza del DNA in cui si ha una variazione del numero di nucleotidi e polimorfismi di sequenza in cui la variabilità tra due tratti di DNA identici è data dalla diversità di una o più basi, definiti anche SNP (Small Nuclear Polimorfism). I polimorfismi possono ritrovarsi nella regione promotrice del gene, oppure nella regione codificante, dando rispettivamente una variazione a livello della quantità del trascritto nel primo caso o nella qualità nel secondo caso. Oggi la quantità di polimorfismi, grazie alle moderne biotecnologie, è diventata sempre più rilevante ed una posizione di spicco stanno assumendo i polimorfismi per le citochine, proteine implicate nei processi infiammatori. Tra queste un ruolo importante riveste il Transforming growth factor β 1.

Studi recenti, che hanno permesso l'individuazione di determinanti genici coinvolti nella produzione di TGF β 1, hanno dimostrato come

l'iperproduzione di tale citochina giochi un ruolo determinante nello sviluppo di patologie cardiovascolari.

Un polimorfismo studiato con grande interesse è quello del codone 10 del TGFβ1, dove la sostituzione di una Timina con una Citosina induce nella proteina lo scambio di una Prolina (wild type) con una Leucina, in questo caso però entrambi gli aa sono apolari e il cambiamento non induce significativi effetti sulla funzionalità della proteina.

Sono stati identificati 7 polimorfismi del gene codificante per TGFβ1:

- 3 nella regione a monte del gene alla posizione -988, -800, e -509 dal primo nucleotide trascritto;
- 1 nella regione non traslata alla posizione +72;
- 2 nella sequenza peptide segnale Leu¹⁰→Pro (869 T→C) and Arg²⁵→Pro (914 G →C) rispettivamente al codone 10 e 25;
- 1 nella regione del gene che codifica per il precursore che fa parte di una proteina che non è presente in forma attiva, Thr263→Ile, nel codone 263.

Tra essi, è stato dimostrato che l'omozigosi per l'allele Arg25 si associa con più elevati livelli circolanti di TGFβ1 e con una più elevata frequenza di malattie riguardanti l'apparato cardiovascolare rispetto, a quanto accade, per i soggetti eterozigoti o omozigoti per la Prolina 25. Ciò si spiega con il fatto che, nel cod25, la sostituzione della Arg con la Pro, corrispondente al cambio di un aa di scarsa polarità (Pro) con un amminoacido dalla grande

polarità, quale l'Arg, causa evidenti cambiamenti nella funzionalità della proteina; inoltre il genotipo Arg-Arg è altresì responsabile di una più elevata produzione di TGFβ1 e di fibrosi, con conseguente maggiore predisposizione a malattie quali l'ipertensione arteriosa (in cui i monociti circolanti periferici hanno una maggiore quantità di TGFβ1).

La presenza dell'allele Arg 25, è stato associato a più elevati valori di pressione arteriosa sistolica paragonati a soggetti con allele Pro 25 . L'allele Pro 25 è più frequente nei pazienti infartuati rispetto ai soggetti di controllo. L'allele Arg 25 è stato associato ad un incremento della produzione dei livelli di TGFβ1 e alla fibrosi. Inoltre pazienti con fibrosi polmonare post-trapianto hanno una più alta frequenza di Arg 25 paragonati a pazienti senza fibrosi. Li e collaboratori hanno evidenziato come l'omozigosi per Arg 25 è più frequente nei pazienti ipertesi rispetto ai controlli normali. Dati dall'ECTIM study e da Li e collaboratori ⁽⁵⁰⁾ supportano l'ipotesi che il polimorfismo per Arg 25 sia associata a più elevati livelli di pressione arteriosa. Gli omozigoti per Arg 25 secernono in vitro livelli proteici più elevati rispetto agli eterozigoti per Arg 25.

Per quel che riguarda il polimorfismo Leu→Pro (TT, TC, CC) un recente studio ha indicato che sia la pressione arteriosa sistolica che diastolica sono più elevate nei soggetti con genotipo CC rispetto a quello con genotipo TT e TC. Questi dati suggeriscono che il gene del TGFβ1 nel cromosoma 19q13.1 può essere un locus candidato per l'ipertensione

soprattutto nelle donne giapponesi. Infine Yokota e collaboratori hanno riportato che la frequenza dell'allele T è significativamente più alta negli uomini con infarto rispetto ai controlli (TT + TC vs CC). I livelli sierici di TGFβ1 sono inoltre maggiori nei soggetti con genotipo CC rispetto a quelli con genotipo TT e TC. L'allele T nel nucleotide 29 del gene TGFβ1 sarebbe un fattore di rischio per la suscettibilità all'infarto del miocardio, almeno negli uomini giapponesi di mezza età.

SCOPO DELLO STUDIO

Il presente studio è stato condotto per steps successivi:

1. Nel primo step abbiamo valutato la distribuzione dei genotipi Arg- Pro e Leu-Pro in un gruppo di soggetti obesi non selezionato ed in un gruppo di controlli normopeso.
2. Successivamente, poiché la distribuzione delle varianti del genotipo Arg-Pro indicava una prevalenza quasi esclusiva (87%) della variante Arg-Arg negli obesi, esso non è stato utilizzato per le successive analisi. La distribuzione invece del genotipo Leu-Pro individuava tre gruppi di soggetti obesi e controlli, potenzialmente paragonabili, per cui le analisi successive hanno previsto la suddivisione degli ipertesi e dei controlli in tre gruppi (TT, TC, CC) (tabella1).

Nei tre gruppi così suddivisi abbiamo analizzato le relazioni tra le varianti genetiche, il TGF β 1 circolante, i livelli sierici del peptide N-terminale del pro-collagene di tipo III (PIIIP) ed alcuni parametri indicativi della geometria e della funzione ventricolare sinistra e della funzione renale.

Obiettivo principale dello studio è stato quello di valutare se le mutazioni genetiche TC e CC potessero individuare sottogruppi di obesi a più alto rischio cardiovascolare e renale.

SOGGETTI E METODI

Popolazione studiata

La popolazione studiata comprendeva 197 soggetti di età inferiore a 65 anni, di cui 130 obesi e 67 controlli normopeso sani, ricoverati presso il Day Hospital della Divisione di Medicina Interna e Cardioangiologia. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato e lo studio è stato autorizzato dal comitato etico della nostra istituzione.

I soggetti venivano considerati obesi sulla scorta dei cut-off di BMI e circonferenza vita suggeriti dalla Consensus italiana sull'Obesità del 1995.

Tutti i soggetti venivano suddivisi in tre gruppi, a seconda del profilo genotipico Leu-Pro (TT, TC,CC).

La prevalenza nei tre gruppi delle principali co-morbilità (ipertensione arteriosa, diabete, ipertrofia ventricolare sinistra, microalbuminuria, retinopatia), così come la prevalenza della distribuzione centrale del

grasso, della familiarità per eventi cardiovascolari precoci, la presenza di alto rischio cardiovascolare e i sono riportate nella tabella 2.

In tutti i soggetti sono stati calcolati i seguenti parametri clinici:

- Familiarità per eventi cardiovascolari precoci (infarto insorto in età inferiore ai 55 anni ed ictus in età inferiore ai 45 anni)
- Rischio cardiovascolare: in accordo con le carte del rischio per l'individuazione dei soggetti a più alto rischio sono state tenute in considerazione il grado di ipertensione, l'età, l'abitudine al fumo, la colesterolemia, la presenza o meno di diabete.

METODI

Parametri ematochimici

Sono state valutate, tramite metodiche di determinazione routinaria, le concentrazioni dell'azotemia, della creatininemia e dei principali parametri ematochimici.

Escrezione Urinaria di Albumina (AER)

La determinazione dell'escrezione urinaria di albumina è stata eseguita mediante kit del commercio sulle urine delle 24 ore ed i valori riportati si riferiscono alla media di AER su tre campioni urinari consecutivi. Negli

ipertesi con valori di proteinuria inferiori a 300 mg/24h è stata altresì determinata la microalbuminuria con tecnica radioimmunologica.

TGFβ1 e PIIP

I livelli plasmatici del TGFβ1 sono stati determinati tramite metodica ELISA (R&D Systems, Inc. Minneapolis, United States of America), secondo una tecnica già ampiamente standardizzata nel nostro laboratorio.

I coefficienti di variabilità inter ed intra osservatore risultavano essere rispettivamente dell'8% e del 6%. La sensibilità del metodo, cioè la quantità minima di TGFβ1 dosabile, era di 5 pg/ml.

I livelli plasmatici del PIIP sono stati determinati tramite metodica radioimmunoenzimatica (Schering Germania). La dose minima rilevabile era pari a circa 0,1 unità di PIIP per ml.

Parametri ecocardiografici

Tutti i soggetti studiati sono stati sottoposti ad un esame ecocardiografico M e B Mode, utilizzando un ecocardiografo computerizzato (ESAOTE, Italia) per la determinazione dei seguenti parametri:

Diametro Telediastolico (DTD), Spessore del Setto Interventricolare (SIV), Spessore della Parete Posteriore (PP), Massa Ventricolare Sinistra totale (LVM) ed indicizzata per l'altezza (LVM/h), Frazione di Eiezione del Ventricolo Sinistro (EF). E' stato altresì calcolato lo

spessore relativo di parete (RWT) mediante la formula: $PP/DTD \times 2$. La convenzione Penn è stata utilizzata per il calcolo della massa ventricolare sinistra. Quest'ultima è stata normalizzata per altezza a 2.7.

Sulla scorta dei valori di $LVM/h^{2.7}$ del nostro laboratorio sono stati considerati con ipertrofia ventricolare sinistra i soggetti maschi con $LVM/h^{2.7} \geq 50 \text{ g/m}^{2.7}$ e $\geq 47 \text{ g/m}^{2.7}$ per le donne. È stata calcolato il rapporto E/A come parametro di funzione diastolica. La frazione di eiezione del ventricolo sinistro è stata misurata dal rapporto tra il volume telediastolico ed il volume telesistolico/volume telediastolico valutati in proiezione quattro camere apicale. Nel nostro laboratorio la frazione di eiezione è stata calcolata sulla media di valori ottenuti su cinque cicli consecutivi con ottima riproducibilità ed accuratezza.

Determinazione dei genotipi Arg-Pro e Leu-Pro

Le tecniche utilizzate comprendono: PCR tradizionale, ARMS e sequenziamento :

Protocollo estrazione di DNA da sangue periferico

Per l'estrazione del DNA è stato utilizzato un kit della Sigma specifico per l'estrazione (GenElute Blood Genomic DNA Kit) di DNA genomico dalle cellule del sangue periferico.

I passaggi per l'estrazione sono stati i seguenti:

- Porre 20 μl di proteinasi K in un eppendorf da 1,5 ml

- Aggiungere 200 µl del campione di sangue all'eppendorf
- Aggiungere 200 µl della soluzione di lisi, fornita dal kit, al campione e centrifugare con il vortex per 20''
- Porre il campione così trattato in un bagnetto termoregolabile a 55° C per 10'
- Nel frattempo preparare le colonnine per l'eluizione, ponendo 500 µl della soluzione di preparazione della colonnina nelle colonnine vuote e centrifugare a 12000 g per 1'. Eliminare la soluzione dalla base della colonnina.
- Prendere i campioni dal bagnetto e aggiungere 200 µl di etanolo per favorire la precipitazione del DNA, in vortex per 15'' per avere una soluzione omogenea.
- Trasferire l'intero contenuto dell'eppendorf nella colonnina precedentemente trattata e centrifugare a 6500 x g per 1'.
- Eliminare la base della colonnina e porre la parte superiore al di sopra di un nuovo tubicino per la raccolta del campione.
- Primo lavaggio: aggiungere alla colonnina 500 µl di una soluzione di prelavaggio fornita dal kit e centrifugare per 1' a 6500 g .
- Rimuovere il liquido alla base della colonnina

- Secondo lavaggio: aggiungere 500 μ l della soluzione di lavaggio alla colonnina e centrifugare per 3' a 12000 x g.
- Porre al di sotto della colonnina un nuovo tubicino. Eluizione del DNA: Pipettare 200 μ l della soluzione di eluizione direttamente al centro della colonnina; Incubare 5 min a temperatura ambiente per permettere alla soluzione di eluizione di avere maggiore efficacia.
- Centrifugare per 1' a 6500 x g.
- Si otterrà il DNA nel tubicino al di sotto della colonnina che potrà essere eliminata.
- Il DNA viene conservato a -20 °C, dopo essere stato analizzato e quantizzato.

PCR tradizionale

Utilizzare tubicini PCR da 0,2 ml

Porre in ognuno di essi

H ₂ O	32 μ l
Buffer 10x	5 μ l
dNTP 2mM	5 μ l
Primer R 100	2 μ l
Primer F 100	2 μ l

DNA stampo	5 μ l
TAQ polimerasi	1/u
DMSO	4 μ l
MgCl ₂	1 μ l

Il programma da noi utilizzato seguiva le seguenti temperature

programma	T°C	Step1	Step2	Step3
	95	T°C	T°C 62	T°C 72
	T sec	95	t sec 30''	t sec 30
	3,30	t sec		''
		45''		
		Go to	Elongation	Storage
		step	T°C 72	T °C 4
		35	T sec 10'	
		cicli		

Primers utilizzati:

Forward 5'-TTCCCTCGAGGCCCTCCTA-3'

Reverse 5'-GCCGCAGCTTGGACAGGAT-3'

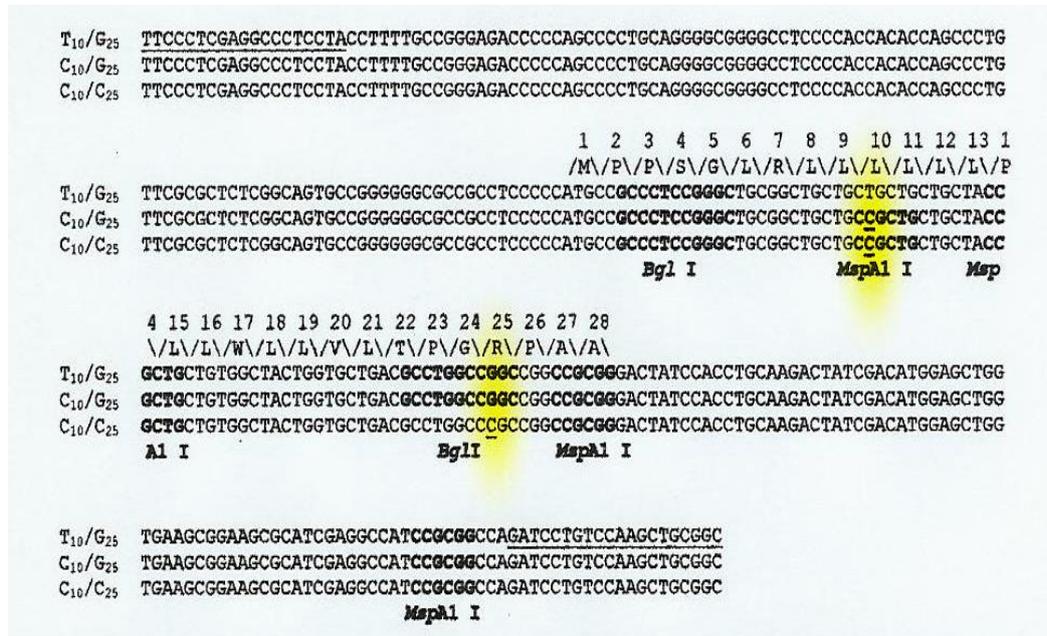


Fig 5 PCR primer. Sequenza amminoacidica segnale del peptide dal codone 1 al codone 28.

PCR ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

Viene definita anche PCR allele specifica, si differenzia dalla PCR tradizionale per il numero di primers utilizzati, tre rispetto ai due canonici e per le modalità, si effettuano infatti reazioni di PCR accoppiate.

Avremo un primer comune in entrambe le reazioni, e un altro presente in due versioni differenti, una specifica per la sequenza normale e l'altra specifica per la sequenza mutante.

Inoltre questo tipo di PCR ci permetterà di discriminare efficacemente tra individui omozigoti ed eterozigoti per la mutazione.

Programma utilizzato:

programma	T°C	Step1	Step2	Step3
	95	T°C	T°C 62	T°C 72
	T sec	95	t sec 40''	t sec
	4'	t sec		40 ''
		Go to	Elongation	Storage
		step	T°C 72	T °C 4
		35	T sec 10'	
		cicli		

Elettroforesi

Su gel di agarosio: allo 0,8 % per l'analisi del DNA genomico

allo 1,2 % per l'analisi del prodotto di PCR.

Pesare 0.8 g o 1,2 g di agarosio

Aggiungere in una beuta 100 ml di TAE 1x più l'agarosio precedentemente pesato.

Portare ad ebollizione.

Aggiungere 3µl di bromuro di etidio alla soluzione

Colare e lasciare raffreddare

Porre il campione nei pozzetti del gel insieme ad un colorante 2x (Loading Buffer)*.

Viene utilizzato nel primo pozzetto un marcatore di peso molecolare

Analizzare il risultato al Transilluminatore

*Loading Buffer 6X in 50 ml

- 0.125 g Blu di bromofenolo
- 0.125 g Xilene
- 17 ml glicerolo 87%
- 33 ml acqua

Sequenziamento genico

I campioni di DNA, prodotti in quantità rilevante per amplificazione mediante PCR, sono stati sottoposti al sequenziamento genico. Questa tecnica, si è rivelata di fondamentale importanza, nel determinare la sequenza nucleotidica del gene per il TGFβ1 nei soggetti esaminati e ha permesso il confronto tra la sequenza del gene wild type con quello mutato.

Sanger:

Esistono diversi metodi di sequenziamento, uno dei più conosciuti è quello di Sanger, da noi usato.

Tale metodica prevede la sintesi di nuovi filamenti di DNA a partire da uno stampo a singolo o doppio filamento, utilizzando un innesco specifico (primer), una DNA polimerasi e una miscela di nucleotidi deossi/didesossinucleotidi.

Vengono condotte in parallelo quattro reazioni base-specifiche, in ciascuna delle quali si utilizza una miscela di tutti e quattro i dNTP (di cui uno marcato) e una piccola "porzione" di uno dei quattro ddNTP. Quando durante la reazione di duplicazione verrà incorporato nel DNA un ddNTP, l'allungamento del filamento cesserà e alla fine della reazione sarà possibile ottenere dei filamenti di lunghezza variabile con un 5' comune ma un 3' differente. Tali filamenti potranno essere in seguito discriminati su un gel di poliacrilammide e letti dal basso verso l'alto.

Sequenziamento automatico:

La tecnica di sequenziamento automatizzato, anche questa utilizzata durante lo studio dei polimorfismi del TGF β 1, si basa sulla tradizionale metodica di Sanger, ma prevede, la possibilità di potere sequenziare più campioni di DNA contemporaneamente e con una maggiore efficienza. In questa tecnica, per le reazioni di duplicazione vengono utilizzati ddNTP

marcati con quattro diversi coloranti fluorescenti o quattro diversi primers marcati. Successivamente i prodotti delle reazioni di amplificazione verranno caricati in singole corsie di un gel di elettroforesi e i dati sulla sequenza determinati durante la corsa elettroforetica, mediante un laser che induce la fluorescenza sul colorante.

I picchi di fluorescenza si avranno a lunghezze d'onda differenti per ciascuno dei quattro tipi di coloranti. Questa informazione verrà registrata elettronicamente e immagazzinata nel computer. Alla fine tale sarà quello che otterremo: inserisci una delle sequenze.

ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i tre gruppi sono state analizzate tramite analisi della varianza ad una via (ANOVA), con il test di Bonferroni per i confronti multipli post-hoc. La differenza nella prevalenza delle varie co-morbilità nei tre gruppi è stata analizzata tramite z test.

Tenuto conto dei risultati, per quanto riguarda i controlli multipli post-hoc, visto che solo il gruppo TC è risultato significativamente diverso per alcune variabili rispetto agli altri due gruppi, per valutare l'associazione tra le variabili oggetto di studio e le varianti alleliche è stata eseguita la regressione logistica, utilizzando le varianti alleliche come variabile risposta (y) e il gruppo TC codificato come 1 vs gli altri due gruppi codificati come 0. Tutti i valori riportati nel testo e nelle tabelle sono espressi come valore

medio \pm deviazione standard. E' stato considerato come significativo un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

I risultati del presente studio sono riportati nelle tabelle.

Distribuzione delle varianti genotipiche Arg-Pro e Leu-Pro negli obesi e nei controlli.

Per quel che riguarda il genotipo Arg.-Pro si è osservata una distribuzione analoga negli obesii e nei controlli, con prevalenza quasi esclusiva del genotipo Arg-Arg (87% negli obesi; 76% nei controlli) per cui la suddivisione degli obesi e dei controlli secondo tale genotipo non è stata oggetto di analisi successive. Per quel che riguarda invece il genotipo Leu-Pro la mutazione TC era significativamente ($p < 0.05$) maggiormente prevalente negli obesii rispetto ai controlli (72%vs 56%). (tabella 1)

Distribuzione delle caratteristiche cliniche delle co-morbilità nei soggetti obesi suddivisi in accordo alle varianti genotipiche (TT,TC,CC).

Dalla tabella 2 si evince che i tre gruppi di obesii erano omogenei per sesso, età e altezza. Nei pazienti con entrambe le mutazioni si sono osservate le seguenti caratteristiche:

- maggiore e significativa prevalenza di familiarità per eventi cardiovascolari precoci ($p < 0.001$), diabete ($p < 0.001$), e soggetti ad alto rischio cardiovascolare ($p < 0.001$).
- Evidente, anche se non significativo, incremento della prevalenza di ipertensione arteriosa e obesità centrale.
- Irrilevanti modificazioni nella prevalenza di IVS, microalbuminuria e retinopatia.

Parametri di funzione renale

Per quel che riguarda i parametri di funzione renale si è osservato un significativo incremento della microalbuminuria nel gruppo TC rispetto ai gruppi TT e CC mentre i restanti parametri erano sovrapponibili nei tre gruppi. Nel gruppo TC i valori di collagene erano significativamente più elevati ($p < 0.05$) rispetto agli altri due gruppi, mentre i valori di TGF β 1 erano soltanto lievemente più elevati ma non in maniera significativa (tabella 3).

Parametri cardiaci

Per quel che riguarda i parametri cardiaci non si sono osservate modificazioni significative nei tre gruppi. (tabella 4).

Regressione logistica

La regressione logistica ha mostrato che il collagene ($p < 0.05$), anche quando corretto per i valori di BMI, di microalbuminuria e di LVM continua ad essere associato con la mutazione TC.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente progetto di ricerca è stato indirizzato all'analisi della distribuzione di alcuni genotipi del TGF β 1 in soggetti obesi ed alle loro relazioni con le co-morbilità ed alcuni parametri di danno cardiovascolare precoce. Tale obiettivo deriva dai risultati di alcuni studi recenti che indicano nell'omozigosi per Arg nel codone 25 un fattore genetico regolatore della produzione di TGF β 1, la cui iperproduzione viene oggi considerata tra i meccanismi che possono indurre danno d'organo .

Altri studi sperimentali hanno dimostrato che lo stesso genotipo è implicato in alcune caratteristiche del processo aterosclerotico . Estremo interesse ha destato inoltre la recente dimostrazione di una possibile associazione, recentemente riportata tra mutazione Leu-Pro del codone 10 ed infarto del miocardio soprattutto nelle donne giapponesi.

Il nostro studio si inserisce tra le attuali problematiche relative all'influenza di fattori genetici nella valutazione delle caratteristiche proprie dell'obesità.

A tal proposito i risultati ottenuti ci permettono alcune considerazioni. La prima riguarda il fatto che negli obesi da noi reclutati il polimorfismo Arg-

Pro era quasi totalmente caratterizzato dall'omozigosi per Arg e ciò non permetteva l'esecuzione di ulteriori analisi, data l'esiguità o l'assenza di pazienti con genotipo Arg-Pro e/o Pro-Pro.

Per quel che riguarda invece la mutazione nel codone 10 della Leucina in Prolina (TC) essa era significativamente aumentata nei gruppi di obesi rispetto ai controlli e negli stessi obesi la somma dei soggetti con entrambe le mutazioni era anch'essa significativamente più elevata di quella presente nei normopeso. Al fine di attenuare alcuni bias di selezione, frequentemente presenti negli studi di associazione, le popolazioni reclutate devono essere geneticamente ed etnicamente omogenee con appropriato gruppo di controllo. Per tali motivi abbiamo reclutato soggetti obesi e controlli normopeso omogenei per quel che riguarda l'etnia ed il pattern genetico.

La correttezza di tale procedura di reclutamento viene ulteriormente avvalorata dalla distribuzione dei genotipi Leu-Pro nel nostro gruppo di controllo che si trovava in equilibrio secondo Hardy-Weinberg. La distribuzione dei genotipi Leu-Pro negli obesi e nei controlli da noi reclutati era inoltre simile a quella riportata da alcuni autori europei,

La valutazione delle caratteristiche cliniche e le co-morbilità da noi analizzate indicavano la presenza nei soggetti con entrambe le mutazioni di un numero significativamente più elevato di obesi con familiarità precoce per eventi cardiovascolari, diabete mellito ed alto rischio cardiovascolare,

suggerendo l'associazione tra la mutazione di questo codone ed una maggiore severità dell'obesità. Tali dati estendono i risultati di precedenti nostri progetti di ricerca che hanno dimostrato un ruolo rilevante dell'iperproduzione di TGFβ1 nella progressione della nefropatia e nella comparsa di alcune alterazioni diastoliche del ventricolo sinistro. Nel presente studio i livelli di TGFβ1 circolante, anche se significativamente maggiori negli obesi rispetto ai controlli, non erano significativamente diversi tra i tre gruppi di obesi suddivisi a secondo della presenza o meno della mutazione sul codone 10. Tale fatto potrebbe avere una duplice spiegazione. La prima potrebbe riguardare il fatto che le mutazione Leu-Pro da noi individuate non sono in grado di indurre modificazioni quantitative nella produzione della proteina. Ciò sarebbe in accordo con quanto recentemente riportato da Grainger et al che hanno individuato in un'altra mutazione, C-1348→ T, quella associata ad una maggiore produzione di TGFβ1. Un'altra spiegazione potrebbe essere quella suggerita da Yokota e collaboratori, i quali indicano che il polimorfismo Leu-Pro potrebbe indurre modificazioni qualitative consistenti in una alterazione del "peptide segnale", forse influenzando il traffico intracellulare o l'efficienza della trasformazione della preproteina in TGFβ. Un altro aspetto del nostro studio che ci sembra di un certo interesse riguarda la produzione di collagene che risulta essere significativamente maggiore negli obesi con la mutazione TC rispetto a quelli senza mutazione. Tale

dato viene altresì avvalorato dall'analisi della regressione logistica che individua nel collagene la variabile più importante caratterizzante la mutazione TC. Ciò rappresenterebbe una ulteriore conferma che la progressione del danno renale e/o cardiovascolare indotta dall'aumentata produzione di TGF β 1 sia mediata da una maggiore produzione di collagene, verosimilmente, secondo i dati del nostro studio, geneticamente determinata. Tale interpretazione potrebbe in ultima analisi spiegare i motivi per cui il gruppo di obesii con genotipo TC sia caratterizzato da una maggiore severità dell'obesità e da una maggiore prevalenza di comorbilità e ciò indicherebbe che i geni codificanti il TGF β 1 possono essere considerati "geni candidati" per lo sviluppo e la progressione dell'obesità. Risulta però opportuno che tali risultati preliminari vengano confermati da studi prospettici su più ampie casistiche, disegnati al fine di individuare nella mutazione Leu-Pro un vero e proprio fattore di rischio cardiovascolare negli obesi.

TABELLA 1. DISTRIBUZIONE DELLE VARIANTI GENOTIPICHE ARG²⁵-PRO²⁵ E LEU¹⁰-PRO¹⁰ NEGLI OBESI E NEI CONTROLLI

	Controlli	Obesii
	N°67	N°130
GENOTIPO DEL TGFβ1 ED ALLELI		
Età	47 ± 10	50 ± 10
Sesso (F/M)	29F/38M	60F/70M
BMI (Kg/m ²)	22 ± 2	31 ± 5
WHR	0,82 ± 0,1	0,93 ± 0,1
Arg ²⁵ →Pro		
Arg-Arg	(51/67) 76%	(113/130) 87%
Arg-Pro	(15/67) 22%	(17/130) 13%
Pro-Pro	(1/67) 2%	(0/130)0%
Arg/Pro+Pro/Pro	24%	13%
Leu ¹⁰ → Pro		
Leu-Leu	(18/67) 26%	(14/130) 11%
Leu-Pro	(37/67) 56%	(94/130) 72%*
Pro-Pro	(12/67) 18%	(22/130) 17%
Leu/Pro+Pro/Pro	74%	89%*

BMI: indice di massa corporea; WHR: Rapporto circonferenza

vita/fianchi.

z test

* p < 0.05 vs controlli

TABELLA 2. DISTRIBUZIONE DEI PARAMETRI CLINICI E DELLE CO-MORBILITA' NEGLI OBESI SUDDIVISI SULLA SCORTA DELLE VARIANTI GENOTIPICHE Leu¹⁰ →Pro¹⁰

Obesi	TT n°14	TC n°94	CC n°22
Sesso (F/M)	6/8	44/50	10/12
Età	55 ± 10	50 ± 9	50 ± 9
Peso (Kg)	75 ± 14	82 ± 15	80 ± 19
Altezza (m)	1,66 ± 0,1	1,66 ± 0,1	1,68 ± 0,1
BMI (Kg/m ²)	27 ± 4	32 ± 5	30 ± 4
WHR	0,92 ± 0,1	0,94 ± 0,1	0,9 ± 0,1
PAS (mmHg)	143 ± 16	146 ± 16	141 ± 16
PAD (mmHg)	87 ± 10	90 ± 11	89 ± 8
PAM (mmHg)	105 ± 11	108 ± 11	106 ± 9
Fam. Precoce (%)	(0/14) 0%	(8/94) 9%*	(4/22)18%*
Fam. Non Precoce (%)	(5/14) 36%	(43/94) 46%	(13/22) 59%
Diabete(%)	(0/14) 0%	(8/94) 9%*	(1/22) 6%*
Ipertensione (%)	9/14 (64%)	71/94 (76%)	18/22 (82%)
Obesità centrale(%)	8/14 (55%)	65/94 (69%)	13/22 (59%)
IVS(%)	4/14 (27%)	27/94 (29%)	6/22 (29%)
Microalbuminuria(%)	11/14 (82%)	61/94 (73%)	14/22 (65%)
Retinopatia(%)	10/14 (73%)	66/94 (70%)	17/22 (76%)
Alto rischio(%)	9/14 (64%)	78/94 (83%)* ^a	16/22 (65%)

BMI: indice di massa corporea; WHR: rapporto vita/fianchi; IVS: Ipertrofia ventricolare sinistra

z test * p< 0.001 vs TT

a p < 0.05 vs CC

**TABELLA 3. PARAMETRI DI FUNZIONE RENALE,
TGFB1 CIRCOLANTE E COLLAGENE NEI TRE GRUPPI
DI OBESI**

Obesi	TT n°14	TC n°94	CC n°22
Azotemia (mg/dl)	39 ± 6	38 ± 7	39 ± 8
Creatininemia (mg/dl)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Clearance(ml/min)	108 ± 30	113 ± 38	112 ± 32
Microalbuminuria (mg/24h)	51 ± 40	113 ± 36 ^{*a}	92 ± 69
TGFβ1 (ng/ml)	45 ± 22	50 ± 15	43 ± 11
PIIIP (U/l)	0,60 ± 0,1	0,71 ± 0,1 [*]	0,65 ± 0,1

TGFβ1: Transforming growth factor β1

* p < 0.05 vs TT

TABELLA 4. GEOMETRIA E FUNZIONE**VENTRICOLARE SINISTRA NEI TRE GRUPPI DI OBESI**

Obesi	TT	TC	CC
LVIDd (mm)	49 ± 3	48 ± 4	48 ± 5
IVSTd (mm)	10 ± 1	9,9 ± 2	9,9 ± 2
PWTd (mm)	9,6 ± 1	10 ± 2	9,6 ± 1
LVM (gr)	167 ± 33	171 ± 40	171 ± 55
RWT	0,39 ± 0,1	0,42 ± 0,1	0,40 ± 0,1
LVM/h^{2.7} (gr/ h^{2.7})	44 ± 8	44 ± 10	42 ± 9
EF %	63 ± 3	65 ± 6	68 ± 9
E/A	1,10 ± 0,07	1,08 ± 0,08	1,10 ± 0,09

LVIDd : Diametro Telediastolico; IVSTd : Spessore del setto interventricolare; PWTd : Spessore della parete posteriore; LVM: massa ventricolare sinistra; LVM/h^{2.7} : massa ventricolare sinistra indicizzata; RWT: Spessore relativo di parete; EF: Frazione di eiezione del ventricolo sinistro

PRINCIPALI FONTI BIBLIOGRAFICHE

- Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH: The disease burden associate with overweight and obesity. JAMA 1999;282:1523-1529
- Licata G, Volpe M, Scaglione R, Rubattu S: Salt regulating Hormones in young normotensive obese subjects. Effects of saline load. Hypertension 1994;23(Suppl 1):20-4
- De Divitiis O, Fazio S, Petitto M, et al: Obesity and cardiac function. Circulation 1981;64:477-482
- Licata G, Scaglione R, Barbagallo M et al: Effects of obesity on left ventricular function studied by radionuclide angiocardiology. Int J Obes 1991;15:295-302
- Licata G, Scaglione R, Paterna S et al: Left ventricular function response to exercise in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. Int J Cardiol 1992;37:223-30
- de Simone G; Devereux RB; Roman MJ, Alderman MH, Laragh Jh: Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. Hypertension 1994;23:600-4
- Scaglione R, Dichiara MA, Indovina A et al: Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects:

influence of degree and duration of obesity. *Eur Heart J* 1992;
13:738-42

- Villareal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF, fibronectin, and collagen. *Am. J. Physiol.* 1992; 262: H 1861-H1866.
- Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ, Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor β 1 expression in rat ventricular myocytes. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 1470-1476.
- Anderson S, Meyer TW, Brenner BM. The role of hemodynamic factors in the initiation and progression of renal disease. *J. Urol.* 1985; 133: 363-368.
- Remuzzi G, Bertani T. Is glomerulosclerosis a consequence of altered glomerular permeability to macromolecules? *Kidney Int.* 1990; 38: 384-394.
- D'Amico G, Bassi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int* 2003; 63: 809-825.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Mamiatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;10: 899-909.

- Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, Hebert CA. Activation of nuclear factor kB correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1995; 48: 1263-1271.
- Wolf G, Mueller E, Stahl Rak, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- β . *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1366-1372.
- Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultures proximal tubular cells. *Cell. Regul.* 1991; 2: 219-227.
- Border WA, Nobel NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 1286-1292.
- Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA, Kietly CM. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor- β binding proteins. *Matrix Biol* 1998; 17: 529-545.
- Ebner R, Chen R-H, Lawler S, Zionecek T, Derynck R. Determination of type I receptor specificity by the type II receptor for TGF β or activin. *Science* 1993; 262: 900-902.
- Shi Y, Massague J. Mechanism of TGF β 1 signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.

- Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J-I, Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P. TGF β receptor mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4." EMBOJ 1997; 16 (17): 5353-5362.
- Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by TGF β superfamily." Science 2002; 296 (5573): 1646-1647.
- Massague J, Wotton D. Transcriptional control of the TGF β /Smad signaling system." EMBOJ 2000; 19: 1745-1754.
- Yoshioka K, Takemura T, Muratami K, et al. Transforming growth factor β protein and mRNA in glomeruli in normal and diseases human kidneys. Lab. Invest. 1993; 68: 154-163.
- Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Genereaux L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirer O. Polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure: The Etude Cas-Temoin de l'Infarctur du Myocarde (ECTIM) Study. Hypertension 1996; 28: 881-887.
- Yokota M, Ichihara S, Lin T-G, Nakashima N, Yamada Y. Association of a T29 \rightarrow C polymorphism of the transforming growth factor β 1 gene with genetic susceptibility to myocardial infarction in Japanese. Circulation 2000; 101: 2783-2787.

- Rao M, Guo D, Jaber BL, Tighiouart H, Pereira BJ, Balakrishan VS; HEMO Study Group. Transforming growth factor β 1 gene polymorphisms and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 66 (1): 419-427.
- Parrinello G, Licata A, Colomba D, Di Chiara T, Argano C, Bologna P, Corrao S, Avellone G, Scaglione R, Licata G. Left ventricular filling abnormalities and obesity-associated hypertension: relationship with overproduction of circulating transforming growth factor β 1. *J Hum Hypertens* 2005; 19 (7): 543-550.
- Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type β 1. *Hum Mol Genet* 1999; 8 (1): 93-97.