

FACULTAT DE MEDICINA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

***ESTUDI GENÈTIC DE LA PROGRESSIÓ DE LA
INSUFICIÈNCIA RENAL: ANÀLISI DE POLIMORFISMES
DE GENS IMPLICATS A LA FIBROGÈNESI***

DOCTORANT: ELISABETH COLL

2004

DIRECTOR:
Dr. Esteban Poch López de Briñas
Especialista Sènior
Servei de Nefrologia. Hospital Clínic

CO-DIRECTOR:
Dr. Albert Botey Puig
Consultor
Servei de Nefrologia. Hospital Clínic

TUTOR:
Dr. Albert Torras Rabassa
Consultor
Servei de Nefrologia. Hospital Clínic

INDEX

1	INTRODUCCIÓ	7
	1.1.1 causes de IRC i definició de la progressió.....	7
	1.1.2 Mecanismes histopatològics:.....	8
	1.1.3 Factors implicats.....	11
	1.1.4 Estudi de la progressió.....	21
1.2	SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA	27
	1.2.1 AngiotensinÒgen:.....	28
	1.2.2 Renina:.....	29
	1.2.3 Enzim conversor de l'angiotensina (ECA).....	31
	1.2.4 Angiotensina II:.....	33
	1.2.5 Receptors de l'angiotensina II: AT1R i AT2R.....	37
	1.2.6 Aldosterona.....	39
	1.2.7 Tractament amb fàrmacs inhibidors del SRAA.....	42
1.3	FACTORS DE CREIXEMENT	47
	1.3.1 Fibrogènesi.....	47
	1.3.2 Citocines en el dany tisular.....	48
	1.3.3 TGF- β	48
	1.3.4 Accions biològiques del TGF- β 1 en la reparació tisular.....	50
	1.3.5 TGF- β 1 en la patologia renal.....	52
	1.3.6 Antagonistes del TGF- β i agents antifibròtics.....	52
1.4	INTERACCIONS ENTRE EL SRAA I EL TGF-β1	54
1.5	FACTORS GENÈTICS I PROGRESSIÓ DE LA INSUFICIÈNCIA RENAL	56
	1.5.1 Evidències Experimentals:.....	56
	1.5.2 Evidències Clíniques:.....	57
	1.5.3 Definició de polimorfisme:.....	59
	1.5.4 Tipus d'estudis genètics en HTA/IR crònica.....	63
	1.5.5 Gen de L'angiotensinogen: polimorfisme M235T.....	65
	1.5.6 Gen de l'ECA: Polimorfisme I/D.....	67
	1.5.7 Gen del Receptor de l'angiotensina II (AT1R).....	69
	1.5.8 Gen de l'aldosterona sintasa (CYP11B2).....	70
	1.5.9 Gen del TGF β 1.....	72

1.5.10	<i>Estudis que evaluen l'efecte de la combinació de diferents polimorfismes genètics en la hipertensió arterial, afectació orgànica de la hipertensió i progressió de la insuficiència renal</i>	74
2	HIPOTESI DE TREBALL	79
3	OBJECTIUS	81
4	MATERIAL I MÈTODES	83
4.1	SUBJECTES	83
4.1.1	<i>POBLACIÓ A ESTUDIAR</i>	83
4.1.2	<i>POBLACIÓ CONTROL</i>	85
4.2	MÈTODES	86
4.2.1	<i>Avaluació de la progressió de la IR</i>	86
4.2.2	<i>Aïllament de L'ADN</i>	86
4.2.3	<i>Quantificació de L'ADN</i>	88
4.2.4	<i>Tècnica de la PCR</i>	89
4.2.5	<i>Polimorfisme M235T de l'angiotensinògen</i>	91
4.2.6	<i>Polimorfisme Inserció/delecció de l'ECA</i>	93
4.2.7	<i>Polimorfisme A1166C del gen del AT1R</i>	94
4.2.8	<i>Polimorfismes -344C/T i WT/conversió del gen de l'aldosterona sintasa</i>	95
4.2.9	<i>Polimorfismes Leu10Pro i Arg25Pro del gen del TGF-β1</i>	97
4.2.10	<i>Anàlisi estadístic</i>	100
5	RESULTATS	103
5.1	<i>Anàlisi de la distribució dels genotips en pacients amb IRT i en controls</i>	103
5.2	<i>2.Anàlisi de progressió cap a la IR terminal segons els diferents genotips</i>	107
5.2.1	<i>2.a. Anàlisi de la supervivència en funció de cada genotip</i>	107
5.2.2	<i>Anàlisi de la relació entre la pendent de la IR i els genotips</i>	115
5.3	<i>Avaluació de les dades clínic-analítiques i la seva influència sobre la progressió de la IR</i>	119
5.3.1	<i>Característiques clíniques de la població a estudi</i>	119
5.3.2	<i>Característiques clíniques en funció dels diferents genotips</i>	121
5.3.3	<i>Anàlisi de la relació amb la pendent de progressió i els diferents factors clínics</i>	126
6	DISCUSIÓ	133
6.1	<i>Selecció dels polimorfismes del SRAA</i>	133
6.2	<i>Selecció dels polimorfismes del TGF-β1</i>	134
6.3	<i>Estudi de la velocitat de progressió com a tret fenotípic heterogeni</i>	136
6.4	ANÀLISI DE LA DISTRIBUCIÓ DELS GENOTIPS EN PACIENTS AMB IRT I EN CONTROLS	139
6.5	ANÀLISI DE LA PROGRESSIÓ CAP A LA IRT SEGONS ELS DIFERENTS GENOTIPS	140

6.5.1	<i>ANÀLISI DE LA SUPERVIVÈNCIA EN FUNCIÓ DE CADA GENOTIP</i>	140
6.5.2	<i>ANÀLISI DE LA RELACIÓ ENTRE LA PENDENT DE LA IR I ELS GENOTIPS</i>	141
6.6	Avaluació de les dades clínic-analítiques i la seva influència sobre la progressió de la ir	143
6.6.1	<i>Relació entre etiologia de la nefropatia i progressió</i>	144
6.6.2	<i>Relació entre la PA sistòlica i progressió</i>	144
6.6.3	<i>Relació entre PTH sèrica i progressió</i>	145
6.6.4	<i>Relació entre tractament amb IECA-ARA-II i progressió</i>	145
6.7	Relació entre patologia cardiovascular i polimorfisme del TGF- β	146
6.8	Comentari final.....	148
7	Conclusions	149
8	BIBLIOGRAFIA	151

1 INTRODUCCIÓ

1.1 PROGRESSIÓ DE LA INSUFICIÈNCIA RENAL

1.1.1 CAUSES DE IRC I DEFINICIÓ DE LA PROGRESSIÓ

Principals causes de insuficiència renal terminal (IRT):

- Diabetis melitus (DM) : 10-40%
- Nefropaties vasculars: 10-20%
- Glomerulonefritis (GN): 15-20%
- Poliquistosi renal (PQR): 7-12%
- Nefritis intersticial (NIC): 8-18%
- Altres (malalties sistèmiques,etc...) : 5-10%
- Causa indeterminada : 10-25%

La progressió de la insuficiència renal (IR) es defineix com una disminució en el temps en el nivell de funció renal. El paràmetre que millor mesura el grau de dany renal és la taxa de filtrat glomerular (FG), que es mesura per l'aclariment de creatinina, o bé estimant el FG per fórmules a partir de la creatinina.

Estratificació de la IR :

- 1 Nefropatia amb FG normal o augmentat, $>90 \text{ ml/min/1.73m}^2$
- 2 FG entre 60 i $89 \text{ ml/min/1.73m}^2$
- 3 FG entre 30 i $59 \text{ ml/min/1.73m}^2$
- 4 FG entre 15 i $29 \text{ ml/min/1.73m}^2$
- 5 $\text{FG} < 15 \text{ ml/min/1.73m}^2$ fins a l'inici de tractament substitutiu renal

1.1.2 **MECANISMES HISTOPATOLÒGICS:**

A les darreres 2 dècades els estudis clínics i experimentals han augmentat el nostre coneixement sobre les causes de la patologia renal. El coneixement dels diferents mecanismes patogenètics (vascular, metabòlic o immunològic) que actuen sobre el glomèrul, l'interstici o ambdós ha provocat el desenvolupament d'importants avanços terapèutics.

La insuficiència renal crònica (IRC), un cop establerta, tendeix a progressar cap a la IRT (independentment de quina sigui l'etiologia). La magnitud del deteriorament anual varia d'uns pacients als altres, i els costos derivats del tractament de la IRT són enormes. A més la IRC és un problema comú, en el "Third National Health and Nutrition Examination Survey" avaluat des de 1988 fins a 1994, s'objectivà que el

3% de la població adulta dels EEUU tenien valors de creatinina elevats (1).

Aquesta variabilitat dins de la progressió cap a la IRT depèn de diferents factors: els relacionats amb l'event inicial, la influència de factors ambientals, i la susceptibilitat genètica pel dany renal.

La majoria dels esforços actuals de cara a frenar la progressió de la IR es dirigeixen a un millor control de la pressió arterial (PA) (2) i a l'ús de fàrmacs inhibidors del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (3,4). La hipertensió arterial (HTA) és el principal contribuent en la progressió de la IR en pacients amb IR amb o sense proteïnúria (5). En el cas de la nefropatia diabètica és més determinant en la progressió el control de la PA que el control de la glucèmia (6). A més a més, la HTA és per sí mateixa un factor de risc pel desenvolupament de la IRT (7,8) i per una altra banda, la prevalença de la HTA augmenta amb la disminució de la funció renal (9).

Els mecanismes que intervenen a la progressió de la IR han estat difícils d'establir degut a que:

1. Els glomèruls i l'interstici tenen un repertori limitat de respostes enfront la lesió i el ronyó respon a diferents insults de forma similar.

Hi ha múltiples mecanismes patogenètics que convergeixen a l'esclerosi, de forma que la majoria d'estructures cel·lulars són reemplaçades per col·lagen, fibroblasts i matriu mesenquimal amb la consegüent disfunció de les funcions de filtració, secreció i reabsorció. Les característiques histològiques del ronyó en fase de IRC avançada són: la glomeruloesclerosi, la fibrosi i atrofia túbul-intersticial, pèrdua de les cèl·lules renals natives i infiltració per monòcits i macròfags.

2. El ronyó danyat té tendència a deteriorar-se quan hi ha una part important afectada de forma que la IR progressa malgrat que la malaltia original no es trobi activa.

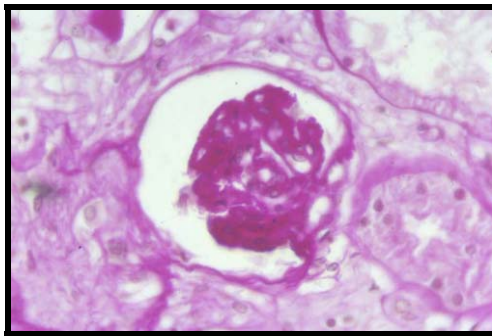


Figura 1.a. Esclerosi glomerular

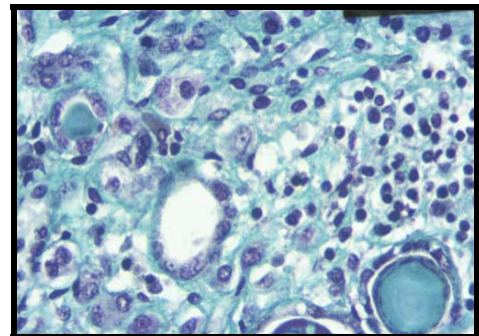


Figura 1.b. Atrofia túbul-intersticial

El deteriorament de la funció renal correlaciona millor amb l'extensió del dany túbul-intersticial que amb l'extensió del dany histològic glomerular (10).

En els darrers estudis s'entén la IR progressiva com un mecanisme de fibrosi progressiva a nivell de l'interstici en el que intervenen per una part el SRAA (3,11) i els factors de creixement (12,13).

1.1.3 FACTORS IMPLICATS

Molts estudis s'han dirigit a identificar els factors que intervenen en la progressió de la IR. Darrerament es tendeix a diferenciar-los en mediadors del dany i factors predisponents.

1.1.3.1 Mediadors del dany:

1. Factors hemodinàmics: Les rates sotmeses a una nefrectomia subtotal, mostren una hiperfiltració compensadora de les nefrones conservades, ajuda a mantenir el FG global. Aquesta adaptació també condueix cap a la hipertensió glomerular, proteïnúria i IRC progressiva (14). Com ja és ben conegut, la nefropatia diabètica en fases inicials produeix un increment del FG (15-17). Experimentalment, s'ha vist un increment de la pressió hidrostàtica en el capil·lar glomerular produint la hiperfiltració, degut a una major reducció de la resistència a l'arteriola aferent respecte a l'arteriola eferent (18). El feedback tubulglomerular contribueix a l'autorregulació del flux plasmàtic renal (FPR) i del FG. Quan augmenta

la pressió hidrostàtica del capil·lar glomerular, incrementa el FG i el flux tubular distal, és detectat pels sensors de la màcula densa que activen mecanismes efectors que a la vegada incrementen la resistència preglomerular reduint el FPR, la pressió glomerular i el FG (19).

En la nefropatia diabètica, la hipertensió glomerular produeix per sí sola un declivi crònic del FG, en part incrementant la fuga proteica a través dels capil·lars glomerulars cap a l'espai de Bowman (20). S'ha descrit que hi ha una massa renal crítica per sota de la qual la hiperfiltració esdevé perjudicial. Pacients amb una pèrdua de la massa renal superior al 50% han demostrat tenir, a llarg termini, un increment del risc de presentar proteïnúria i IR (21).

2. Hipòxia: La hipòxia s'ha considerat tant una causa com un efecte de la progressió. S'ha descrit una pèrdua dels capil·lars intertubulars post-glomerulars en la IRC de diferents etiologies (22). L'esclerosi glomerular hi contribueix disminuint el flux sanguini tubular. L'expansió de l'espai intersticial pot també disminuir la perfusió capil·lar dels túbuls (23). La hipòxia resultant afavoreix l'alliberament de les citocines pro-inflamatòries i fibròtiques.

3. Proteïnúria: La proteïnúria es produeix com a resultat de la hipertensió capil·lar glomerular i del dany de la permeabilitat de la membrana basal

glomerular. La fuga proteica a través del glomèrul es captada per les cèl·lules del túbul proximal per endocitosi. Això produeix una sobrecàrrega proteica a nivell de les cèl·lules tubulars proximals que augmenta l'activació de l'enzim conversor de l'angiotensina (ECA) intrarrenal (24) i consecutivament via directa o mitjançant factors de transcripció (25), provoca una producció anormal de les següents citocines: ET-1, "monocyte chemoattractant protein", entre d'altres (26). Aquestes citocines afavoreixen la fibrosi, l'apoptosi i la infiltració per monòcits propagant el procés. Diversos estudis han mostrat una correlació significativa entre la proteïnúria i la velocitat de progressió, especialment en diabètics (27-30). La proteïnúria no selectiva conté nombrosos sistemes tòxic-inflamatoris que promouen la progressió de la IR: tots els components de la via alternativa del complement hi són presents; les lipoproteïnes inflamatòries interactuen amb les cèl·lules de l'epiteli tubular renal induint citocines que promouen la inflamació; el ferro o la transferrina filtrats indueixen la formació de radicals lliures d'oxigen que també són tòxics per les cèl·lules de l'epiteli tubular renal (31,32).

4. Hipertensió arterial sistèmica: La HTA és per sí mateixa una important causa de IR progressiva i quan la HTA apareix com a resultat de la

patologia renal, és el factor de risc predominant per la pèrdua accelerada de la funció renal. Un tractament precoç i efectiu de la PA en pacients amb nefropatia és la terapèutica més eficaç per disminuir la progressió de la patologia renal (33) i per disminuir la morbiditat i mortalitat cardiovascular en pacients amb IRC ja sigui abans o després d'iniciar la teràpia renal substitutiva (34).

5. Activació del complement: Degut a la permeabilitat glomerular anormal, el complement pot entrar dins de la llum tubular i iniciar la formació del complex d'atac de membrana C5b-9 (35).
6. Angiotensina II: Com ja comentaré més endavant, els ronyons contenen tota la maquinària necessària per generar Angiotensina II local (36). Aquest sistema de renina-angiotensina (SRA) intrarrenal està regulat de forma independent del sistèmic i juga un paper crític en l'autorregulació renal i el desenvolupament dels diferents processos fisiopatològics (37).
7. Aldosterona: També comentaré més endavant els diferents mecanismes pels quals l'aldosterona pot mitjançar la progressió de la IR.

8. Altres mediadors químics:

8.a. *Transforming-growth factor β (TGF- β):* Es comentarà més endavant

8.b. *Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1):* Hi ha 2 sistemes principals implicats en la degradació de la matriu extracel·lular (MEC): el sistema del plasminògen i el sistema de les metaloproteïnasses de la matriu. El PAI-1, que s'expressa en el ronyó danyat crònicament, inhibeix la conversió de plasminògen en plasmina i l'activació de les metaloproteïnasses de la matriu conduint a un dipòsit de la MEC (38).

8.c. *Òxid Nítric:* Inhibeix la proliferació mesangial i la síntesi de la MEC i pot limitar la permeabilitat capil·lar; per tant resultaria ser un mediador protector. La producció d'òxid nítric ha demostrat estar disminuïda en la IRC en la majoria dels estudis però no en tots. Varies substàncies sobreexpressades en la IR (tals com el PAI-1 (39), dimetil arginina asimètrica (40), PDGF (41), TGF- β (42) i ET-1 (43)) poden inhibir l'òxid nítric sintasa produint una disminució de la L-arginina a l'òxid nítric.

8.d. *Endotelina:* Hi ha diferents mecanismes pels quals l'endotelina pot jugar un paper en la progressió de la IR:

- Bloqueig de la transcripció de l'òxid nítric sintasa induïble via receptor ET-a (44)

- Augment de l'expressió del gen del col·lagen 1 (45)
- Per remodelatge vascular (46)
- Per mediació de la proteïnúria (47)
- Estimulant la quimiotaxis de macròfags (44)
- Estimulant la proliferació dels fibroblasts intersticials i la síntesi de la MEC. (44)

8.e. *Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB)*: Implicat en la progressió de la IR, estimula la proliferació mesangial i augmenta la síntesi de la MEC. Dues cadenes, PDGF-A i PDGF-B, formen els homodímers o heterodímers. A nivell experimental el PDGF-BB indueix la transdiferenciació dels miofibroblastes renals i la fibrosi túbul-intersticial (48). També augmenta l'expressió del col·lagen tipus III per les cèl·lules tubulars i els miofibroblastes (49).

1.1.3.2 Factors predisponents:

1. Etiologia de la nefropatia: La velocitat de pèrdua de FG també està relacionat amb el tipus de nefropatia: en general s'ha vist que la nefropatia diabètica, les GN, la PQR i la nefropatia del trasplantament es troben associades amb una major pèrdua de funció renal respecte als pacients amb nefroangiosclerosi (NAS) i patologia túbul-intersticial. La

velocitat de pèrdua de funció renal a la PQR o a la NIC, s'ha vist que és menor que a les GN (50). L'aclariment de creatinina cau més ràpid en nens amb glomerulopaties que en nens amb hipoplàsia o nefropatia vascular; les nefropaties hereditàries també progressen més ràpidament que les nefropaties vasculares (51).

2. Sexe: El sexe masculí està relacionat amb una progressió més ràpida de la IR (50,52,53). Les dones amb PQR autosòmica dominant progressen més lentament que els homes (54), observacions similars s'han descrit en pacients amb nefropatia membranosa (55) i en nefropatia IgA (56).

Entre els mecanismes postulats hi ha l'increment de la resposta a l'angiotensina II en els homes (57) i l'efecte favorable dels estrogens en l'hemodinàmica glomerular. Els estrogens antagonitzen els efectes de l'aldosterona, disminuint els seus efectes fibrogènics (53), a més l'estradiol es capaç de revertir la fibrogènesi mitjançada pel TGF- β (58).

3. Raça: A la raça negra la IRC progressa més ràpid que a la blanca per raons no del tot conegudes (59,60). Els factors socioambientals i l'entorn genètic s'han proposat com condicionants de la tendència cap a una excessiva progressió de la IR en africans americans.

4. Dislipèmia: La IRC s'associa a un increment dels nivells de triglicèrids, lipoproteïnes de baixa densitat, lipoproteïna (a) i disminució de l'apoproteïna (a). La IR per sí sola pot promoure la hiperlipidèmia mitjançant la sota-regulació de l'expressió de l'enzim lecitín-colesterol aciltransferasa al fetge i la seva activitat al plasma (61). Recentment s'ha descrit una correlació entre una pèrdua més ràpida de la funció renal i els nivells circulants d'Apo B, colesterol i triglicèrids (62). La hiperlipidèmia podria afectar adversament la funció glomerular degut a la captació de les lipoproteïnes oxidades (63). Experimentalment la hipercolesterolèmia i la hipertrigliceridèmia poden promoure proteïnúria i dany túbul-intersticial (64), mentre que el tractament hipolipemiant milloraria la velocitat de progressió (65). A més la hiperlipidèmia afavoreix l'aterosclerosi de les artèries renals i de les seves grans branques, sobretot a la gent gran.

5. Edat: La relació de la pèrdua del FG amb l'edat està basada en un estudi realitzat per Hebert et al, en que analitzà l'aclariment de iodotalamat a 357 individus d'edats compreses entre 17 i 70 anys, objectivant una caiguda del FG d'1ml/min/any a partir dels 45 anys (66). Aquesta seria la pèrdua fisiològica de la funció renal.

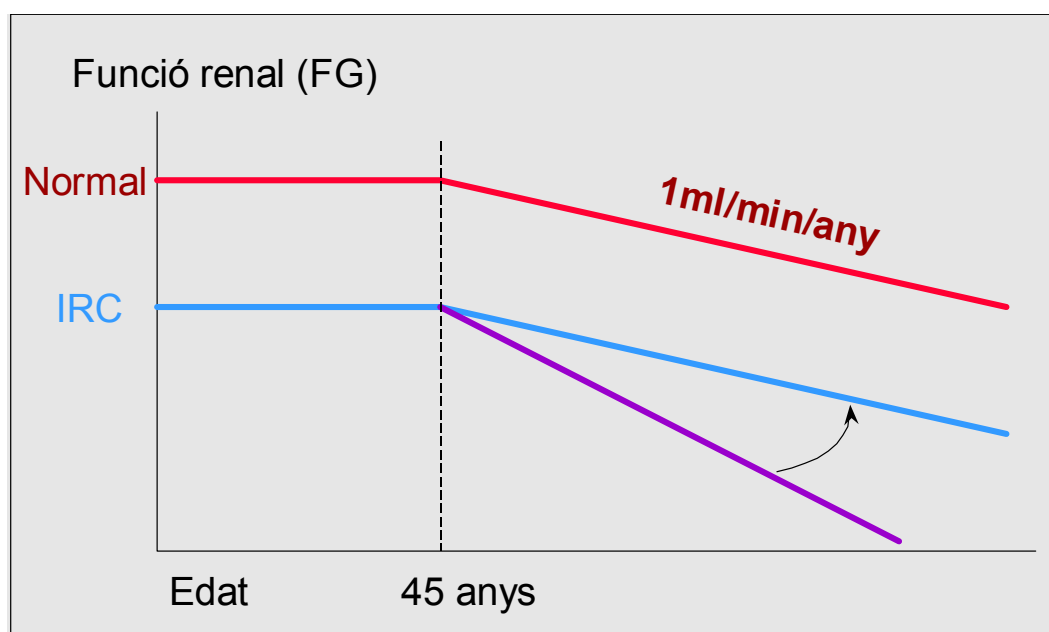


Figura 2. Velocitat de pèrdua de FG en individus normals i en pacients amb IRC.(66)

6. Tabaquisme: El tabac té efectes vasoconstrictors, trombòtics i tòxics directes sobre l'endoteli vascular. El consum de cigarretes es un factor de risc independent per a la progressió de patologia renal inflamatòria (nefropatia IgA), patologia renal no inflamatòria (PQR) i nefropatia diabètica (67).

7. Hiperglicèmia: La hiperglicèmia provoca hiperfiltració i hipertròfia glomerular i hipertensió. Una glucèmia elevada indueix el dipòsit de proteïnes glicades a la matriu renal, acumulant-se i interferint amb la funció vascular. Això pot succeir inclòs amb hiperglicèmia moderada si té

una durada suficient i va associada als factors genètics apropiats (68). S'ha vist que els homes amb DM tenen una incidència major de IRT deguda a causes no diabètiques inclòs després d'ajustar-ho per l'edat, ètnia, ingressos, PA, colesterol i història de patologia arterial coronària (69).

8. Augment de l'homocisteïna plasmàtica: La hiperhomocisteïnèmia és un factor de risc per l'aterotrombosi (70) i per la microalbuminúria en la nefropatia diabètica (71), probablement degut al dany endotelial produït per l'estrès oxidatiu.

9. Hiperfosfatèmia: Hi ha estudis en animals i humans que indiquen que la hiperfosfatèmia promou la progressió de la patologia renal, possiblement afavorint el dipòsit de calci i fosfat a nivell tisular i/o hiperparatiroidisme (72).

10. Anèmia: Un estudi randomitzat en pacients objectivà que si es controlava la PA, la progressió de la IR s'alentia amb la correcció de l'anèmia amb l'administració d'eritropoietina (73).

-
11. Factors prenatals: Estudis en animals han mostrat una disminució en el nombre de glomèruls induint malnutrició uterina (74), però no en relació amb la pèrdua de pes en el moment del naixement (75). En els humans el nombre de glomèruls correlaciona directament amb el pes de naixement (76). Així mateix, hi ha una correlació directa entre baix pes de naixement i IRC (77).
12. Drogues d'abús: El consum d'heroïna i d'altres opiacis (78) i de cocaïna s'han relacionat amb un risc augmentat per desenvolupar IRT (79). La cocaïna pot exacerbar la NAS hipertensiva a través de la progressió de la isquèmia renal.
13. Altres: Augment de la ingesta proteica (66), augment de la ingesta de NaCl (80), obesitat (81), increment de la insulina endògena (increment del pèptid C) (82), agents antiinflamatoris (83), deplecció de potassi (84,85), etc.

1.1.4 **ESTUDI DE LA PROGRESSIÓ**

Actualment s'han descrit diferents tècniques, cadascuna d'elles amb diferents avantatges o desavantatges:

- Mesura de la velocitat del canvi de l'invers de la creatinina: A la majoria dels pacients amb IR progressiva, la mesura de la pèrdua de la funció renal usant l'invers de la creatinina respecte el temps permet obtenir una línia recta, la pendent de la qual ens indica si van més o menys ràpids (86,87). En un subgrup de pacients aquesta progressió lineal no es compleix. En aquest sentit Shah et al. van usar el mètode d'anàlisi del "break point" per determinar aquell punt en que la progressió presentava un canvi de pendent i van veure que en el 32% dels seus pacients la mesura de la progressió quedava millor ajustada per 2 línies rectes que per una sola (88,89) . Per contra, l'estudi de Coresh et al. va trobar significatiu solament el 19% dels "break point" practicats als seus pacients (90). Fins i tot en aquelles situacions en que no es troba "break point", les pendents de l'invers de la creatinina respecte al temps poden donar informació insuficient per avaluar la progressió (86,91,92).
- Progressió mesurada amb el canvi de l'aclariment de creatinina: A no ser que s'administri cimetidina 2 hores o 24 hores prèvies a la mesura de l'aclariment de creatinina (per bloquejar la secreció tubular que es troba augmentada a les fases avançades de la IR i ens pot donar mesures superiors a les reals), l'aclariment de creatinina és un

indicador inadequat del FG. Així doncs no sorprèn que la pendent dels canvis seqüencials de l'aclariment de creatinina, estigui poc correlacionat amb el pendent dels mesuraments seqüencials del FG (93-95).

$$\text{Aclariment de creatinina: } Ccr = \frac{Cr\ O \times Vm}{Cr\ S}$$

Cr O= creatinina en orina en mg/dl

Cr O x Vm= excreció urinària de Cr en mg/minut

Vm= volum/minut (diuresi 24 hores / 1440 minuts)

Cr S= creatinina sèrica en mg/dl

- Càlcul de la pendent a partir del càlcul del FG mitjançant l'Equació de Cokcroft i Gault (96):

$$\text{Cl creatinina (ml/min)} = (140 - \text{edat}) \times \text{pes} / (72 \times Cr\ S)$$

(es multiplica el resultat x 0.85 a les dones)

o mitjançant l'Equació MDRD (97-98):

$$\text{Cl creatinina} = 170 \times (Cr\ S)^{-0.999} \times (\text{edat})^{-0.176} \times BUN^{-0.17} \times Alb^{0.318}$$

(es multiplica x 0.762 a les dones)

L'equació de MDRD té alguns avantatges; és més acurada i precisa que l'equació de Cockcroft i Gault per persones amb FG <90 ml/min/1.73m². Aquesta equació prediu el FG com el mètode del I¹²⁵-iodotalamat. Tot i això, aquesta equació no ha estat validada en nefropatia diabètica, en pacients amb condicions comòrbides severes, en persones normals o en persones >70 anys.

- La mesura més ideal per seguir la progressió de la IR seria el càlcul de la pendent a partir de la mesura del FG mitjançant tècniques isotòpiques, que són les més exactes (99). Això habitualment no es fa, degut a que perquè fos útil caldrien com a mínim quatre determinacions separades de forma regular en el temps, i a més els pacients diagnosticats en fases inicials haurien de ser seguits durant molts anys amb múltiples determinacions del FG per establir una velocitat de progressió estadísticament significativa.
- Temps des del descobriment de la IR fins arribar a l'hemodiàlisi(HD): tampoc dona una idea exacta de la progressió, perquè en un mateix pacient la IR inicialment pot progressar més lentament i posteriorment avançar molt més ràpid cap a la IRT, o viceversa.

-
- Temps de duplicació dels nivells de creatinina sèrica: molts pacients no assolixen aquest punt final (doble de valor de creatinina respecte al valor inicial) si l'interval no és suficientment perllongat.

 - Corbes de supervivència: una altra forma d'estudiar la progressió és mitjançant la comparació de les corbes de supervivència, agafant com a punt final l'entrada en programa d'HD. El problema es la manca d'un criteri unificat per iniciar el tractament substitutiu, i que cal un seguiment perllongat (com a mínim quatre anys). L'avantatge principal és que evita l'assumpció de linealitat.

 - Limitacions a l'hora d'estudiar la progressió:
 1. *Moment del diagnòstic*: La IR en fases inicials cursa de forma silent i es sol descobrir en fases més avançades o per contra en fases precoces asimptomàtiques per anàlisi practicades de forma casual o per altres motius. Per tant els pacients procedents d'estudis retrospectius poden haver estat diagnosticats en fases diferents de la seva IR.
 2. *Manca de linealitat*: Una altra limitació prové de malalties tipus nefritis lúpica o altres GN, que poden fer brots nefrítics amb insuficiència renal aguda (IRA) i que poden respondre molt bé al tractament immunosupresor retornant als nivells bassals de FG. En

aquest tipus de patologia que avança per brots es molt difícil quantificar la velocitat de progressió.

3. *Distribució de les velocitats de progressió*: IRC descobertes en fases precoces que gairebé no progressen o es queden estables durant molts anys, caldrien estudis prospectius amb molts anys de seguiment. Sawicki et al. van seguir 66 pacients amb DM insulíndependent i IRC mitjançant aclariments d'inulina durant 2 anys i van observar que un 51% milloraven, el 39% empitjoraven i un 10% romanien estables (100). Toto et al. van estudiar 87 pacients hipertensos no-diabètics amb FG <70 ml/min/1.73m² durant 40 mesos, amb un bon control de la PA; la majoria de les pendents eren inferiors a 1 ml/min/any, tot i que 9 pacients van duplicar la creatinina sèrica (101).

1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA

El SRAA a través dels seus efectes hemodinàmics (sobretot vasoconstrictor de l'arteriola eferent) i no hemodinàmics (inductor del creixement cel·lular) és un dels principals implicats en el desenvolupament i la progressió de la IR (3). En aquest sentit s'ha vist que els animals transgènics que expressen un gen de renina addicional mostren un empitjorament més ràpid de la funció renal que aquells sense el gen addicional, sense que es produeixin canvis a la PA sistèmica (102). I a més, la transferència de gens de renina i angiotensinògen humans a ronyons de rates, indueix l'esclerosi glomerular (103). D'altra banda, l'administració d'inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina (IECA) ha demostrat tenir efectes protectors sobre el ronyó, reduint la microalbuminúria i retardant la progressió de la IR, amb una eficàcia superior de la que s'espera pel seu efecte hipotensor (3,4). Així mateix, en els models experimentals de HTA, els antagonistes del receptor de l'angiotensina II (ARA-II) també han demostrat tenir efectes protectors sobre el cor i el ronyó alentint la progressió de la nefropatia (3,11), ressaltant l'acció de l'angiotensina II com a fonamental en aquest procés. Malgrat tot, l'efecte protector sobre el ronyó del bloqueig del SRAA no és complert, i hi ha un percentatge de

malalts que progressa cap a la IRT. Per aquest motiu, altres factors a més del SRAA són també importants en la gènesi i progressió de la IR, com es veurà més endavant.

1.2.1 ANGIOTENSINÒGEN:

L'angiotensinògen és una glicoproteïna globular que conté quatre llocs de glicosilació, amb una massa molecular que varia entre 55 i 65 KDa segons amb el seu estat de glicosilació. El fetge és el principal lloc de síntesi tot i que també es pot sintetitzar al cervell, grans artèries, ronyó i teixit adipós. Aquesta proteïna no s'emmagatzema al fetge, sinó que es secreta de forma continuada, de manera que els seus nivells plasmàtics reflexen la seva síntesi. L'angiotensinògen pot considerar-se com una pro-hormona que sota l'acció (hidròlisi) de l'enzim renina és convertit en angiotensina I.

La síntesi de l'angiotensinògen està regulada per diferents hormones. Els estrògens i els glucocorticòids estimulen la seva secreció (104). També augmenten els seus nivells en els processos infecciosos o en lesions tisulars, fet que podria explicar-se per l'augment dels glucocorticòids endògens que es produeix durant aquests processos, tot i que s'ha vist que el gen de l'angiotensinògen conté elements que

responen als reactants de fase aguda (105). La tiroxina i els andrògens també influeixen en la seva síntesi, i a l'embaràs també incrementa l'angiotensinògen plasmàtic, especulant-se el seu origen placentari (106). Quan hi ha una binefrectomia també incrementen els nivells d'angiotensinògen sense que se'n conegui la causa.

L'angiotensina II produeix un "feedback" positiu sobre la síntesi del ARN missatger (ARNm) de l'angiotensinògen i la producció proteica, mentre que la renina inhibeix la seva alliberació (107). Durant l'administració d'IECA s'objectiva una disminució de l'angiotensinògen plasmàtic i es pensa que aquest descens és degut a un augment del seu consum per la renina plasmàtica i a una disminució de la seva síntesi hepàtica. S'ha vist però que la regulació del SRAA no depèn de la modificació de la concentració de l'angiotensinògen; l'adaptació als canvis en la ingesta de sal estant mediat per una variació brusca en l'alliberament de la renina, mentre que la concentració de l'angiotensinògen no es modifica (108).

1.2.2 **RENINA:**

La renina circulant es sintetitza al ronyó en forma de preprorenina, que té un pes molecular aproximat d'uns 45 KDa. Posteriorment és

glicosilada donant lloc a la prorenina amb un pes molecular de 47 KDa. Després s'emmagatzema en grànuls de les cèl·lules juxtaglomerulars, on es converteix en renina activa amb un pes molecular de 40 KDa.

La renina té una vida mitja de 15-20 minuts i es metabolitza principalment al fetge, encara que una petita proporció ho fa al ronyó. En situacions d'alteració de la funció hepàtica es produeix una disminució del seu aclariment (109).

La renina és un enzim secretat per les cèl·lules de l'aparell juxtaglomerular com a resposta a fenòmens que disminueixen la PA, la perfusió renal o l'aportació de NaCl a la màcula densa i el sistema nerviós simpàtic (110). Dintre d'aquests fenòmens s'inclouen canvis de posició o en la volèmia efectiva (tals com la deplecció de sal, hemorràgia, insuficiència cardíaca, síndrome nefròtic i cirrosi).

En el control de feedback hi participen: els barorreceptors de les arterioles aferents, els receptors NaCl-sensitius de la màcula densa i l'activitat del sistema nerviós simpàtic renal eferent. En aquest sentit, els nivells de renina circulants estan sotmesos a una estreta regulació i sotmesos a constants ajustaments.

Sota circumstàncies normals, els canvis en la biosíntesi i la secreció renal de la renina, són els principals determinants de la formació de l'angiotensina II plasmàtica. La renina actua sobre l'angiotensinògen convertint-lo en el decapeptid angiotensina I, el qual mitjançant l'ECA, que es troba localitzat a la superfície endotelial i a la circulació, es transforma en angiotensina II.

1.2.3 ENZIM CONVERSOR DE L'ANGIOTENSINA (ECA)

L'ECA és un ectoenzim ancorat a la membrana cel·lular, amb el seu lloc catalític exposat a la superfície extracèl·lular. És un component del SRAA i del sistema Kalicreïna-Cinina, convertint l'angiotensina I en angiotensina II, inactivant la bradiginina. Aquestes dues hormones tenen efectes oposats en el to vascular i en la proliferació cel·lular.

L'ECA és una metalopeptidasa que processa l'angiotensina I en l'octapeptid actiu angiotensina II. La forma més àmpliament distribuïda de la ECA (present a cèl·lules endotelials i epitelials) és l'anomenada forma somàtica en contrast amb la isoforma germinal de la ECA (trobad a als testicles). La forma somàtica té un pes molecular de 170 KDa i té una estructura repetitiva amb 2 dominis homòlegs. La isoforma germinal té un pes molecular menor de 90 Kda però amb propietats enzimàtiques

similars a la isoforma somàtica. Recentment s'ha descrit un homòleg de l'ECA anomenat ECA2, caracteritzada per tenir un sol domini enzimàtic que catalitza la transformació de l'angiotensina I a angiotensina 1-9, no pot ser inhibida pels IECA; també intervé en la conversió de l'angiotensina II a angiotensina 1-7, solament s'ha identificat a cor, testicles i ronyó i es desconeix el seu paper en la regulació del SRAA (111).

L'ECA es troba àmpliament distribuïda per tot el cos. És un component de les membranes de totes les cèl·lules endotelials així com d'algunes cèl·lules epitelials i neuronals.

El seu paper fisiològic en diferents llocs (cervell, aparell reproductor i gastrointestinal) no és conegut. A nivell cerebrovascular, probablement actua com a mecanisme de control secundari per regular la concentració d'angiotensina II als teixits perifèrics. Intervé en la regulació de diferents funcions cardiovasculars, regulació del flux sanguini perifèric regional, modulació de l'activitat simpàtica local i estimulació del creixement i hipertròfia de les cèl·lules musculars llises. A la glàndula adrenal, l'enzim s'expressa principalment a nivell medul·lar, el que recolzaria un paper més important en l'alliberament de catecolamines que en la síntesi d'aldosterona (112).

1.2.4 **ANGIOTENSINA II:**

L'angiotensina II és la principal hormona del SRAA. L'angiotensina II produeix una contracció de la musculatura llisa vascular i un augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic augmentant el flux simpàtic central i augmentant la quantitat de norepinefrina alliberada per les terminacions nervioses simpàtiques per impuls neural. L'angiotensina II també estimula l'alliberació de norepinefrina i epinefrina des de la medulla adrenal, té efectes antinatriurètics i antidiurètics al ronyó i promou l'alliberació de vasopresina de la pituitària i d'aldosterona de la zona glomerulosa adrenal. Amb la combinació de totes aquestes accions, el SRAA juga un paper principal en el control de la PA i del volum extracel·lular. A més dels seus efectes en l'homeostasi cardiovascular, l'angiotensina II també juga un paper en la regulació de la funció cerebral i contribueix en el control del creixement cel·lular (113-118), essent més important per això que per la vasoconstricció.

Produeix un increment de la PA de diferents maneres, mitjançant el receptor tipus 1 de l'angiotensina II (AT1R):

- 1er Com a vasoconstrictor potent, augmentant la resistència vascular perifèrica
- 2on Promou la reabsorció de sal mitjançant el transportador Na⁺/H⁺ del segment S1 de la nefrona proximal

- 3er Estimula la biosíntesi i secreció d'aldosterona per la zona glomerulosa renal, la qual indueix la reabsorció de Na⁺ per les cèl·lules principals del conducte col·lector.

La retenció de sal és responsable de l'increment del volum extracel·lular, que augmenta la pressió hidrostàtica i així mateix pot augmentar la sensibilitat vascular a l'angiotensina II i a altres vasoconstrictors (119).

1.2.4.1 SRAA i ronyó:

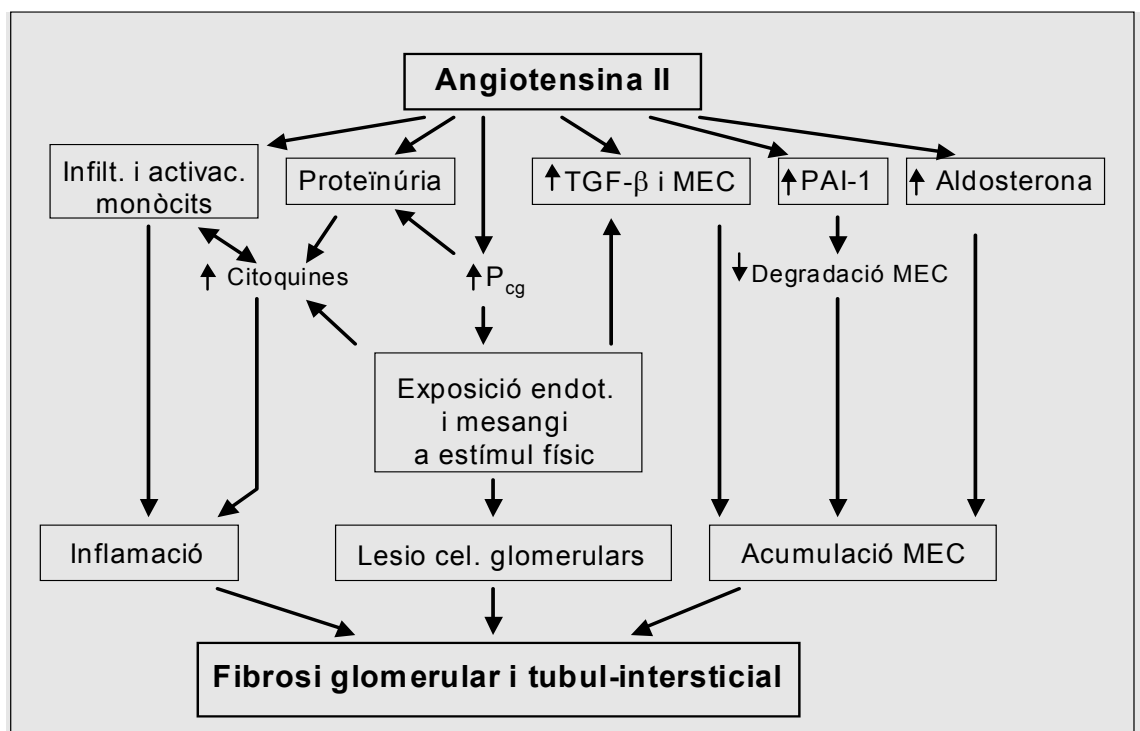


Figura 3. Esquema dels mecanismes d'actuació de l'angiotensina II en la progressió de la IR (120).

El SRAA tradicionalment s'ha considerat el principal regulador del volum intravascular i la PA sistèmica. Inicialment definit com a sistema endocrí, estudis recents suggereixen que també funciona a nivell autocrí-paracrí

Els components del SRA es troben a diferents teixits, i hi ha evidència d'una síntesi local d'angiotensina II.

Diferències entre el SRA tisular i SRA endocrí:

- Estan regulats independentment
- El SRA tisular està més implicat en la regulació vascular crònica (121,122)
- L'activitat renina plasmàtica no reflexa la producció intrarrenal d'angiotensina II: la concentració d'aquesta hormona és 1000 vegades superior al ronyó que al plasma (123).

L'angiotensina II generada a nivell local s'uneix als receptors del glomèrul i causa constricció de les cèl·lules mesangials i de les arterioles aferent i eferent alterant el coeficient d'ultrafiltració glomerular. A més a nivell renal, l'angiotensina II produeix una expansió del mesangi deguda a la proliferació/hipertrofia de les cèl·lules mesangials i a un augment de la MEC(124).

1.2.4.2 Angiotensina II com a factor de creixement:

La majoria dels nostres coneixements sobre l'angiotensina II com a factor de creixement deriven d'estudis sobre els seus efectes sobre les cèl·lules musculars llises vasculars aïllades (115,116,125,126). En

aquestes, en presència de sèrum l'angiotensina II produeix hiperplàsia (127), mentre que en absència de sèrum indueix hipertròfia (128).

1.2.4.3 Angiotensina II i matriu extracel·lular (MEC):

Als glomèruls els principals contribuents a l'acúmul de la MEC són els col·làgens tipus IV i V, les glicoproteïnes laminina i fibronectina i els proteoglicans heparan sulfat, condroitin i dermatan sulfats, tots ells sintetitzats per les cèl·lules mesangials en cultiu. En determinades condicions de cultiu i en situacions patològiques, les cèl·lules mesangials també sintetitzen grans quantitats de col·làgens intersticials (tipus I i III). Diversos estudis han demostrat que l'angiotensina II estimula la síntesi dels components estructurals de la MEC a les cèl·lules mesangials i de la musculatura llisa vascular in vitro, observant-se un augment de l'acúmul glomerular de fibronectina i col·làgen que produeix fibrosi associada a proliferació mesangial (129-132).

1.2.4.4 SRAA i fibrosi intersticial renal

La IR progressiva s'acompanya d'un infiltrat intersticial de cèl·lules mononuclears que precedeix i acompanya l'atròfia tubular i la fibrosi intersticial. La progressió de les diferents formes de GN està determinada més pel grau de dany túbul-intersticial que per l'extensió de

l'afectació glomerular. Alguns investigadors han suggerit que la infiltració de l'interstici renal per cèl·lules inflamatòries pot conduir a l'atròfia tubular i a la fibrosi intersticial a través de la secreció de citocines i factors de creixement, amb el conseqüent estímul dels fibroblasts a proliferar i produir proteïnes de la matriu (133). Les darreres dades suggereixen que el SRAA circulant i tisular juga un important paper a la fibrosi intersticial renal. Així s'ha vist que la infusió endovenosa d'angiotensina II va seguida d'un infiltrat intersticial renal per cèl·lules mononuclears seguida d'un increment en la síntesi de fibronectina i col·lagen intersticial pel ronyó (134).

1.2.5 RECEPTORS DE L'ANGIOTENSINA II: AT1R I AT2R

Per a produir les seves accions, l'angiotensina II interacciona amb receptors específics a la superfície de les cèl·lules diana. La majoria de les accions de l'angiotensina II es deuen a la interacció amb els receptors AT1R i AT2R, tot i que hi ha altres subtipus de receptors (135-138).

Els receptors AT1R predominen en els òrgans i teixits involucrats en el balanç hidroelectrolític i la regulació de la PA. Així els receptors AT1 es troben principalment en les adrenals, musculatura llisa vascular, ronyó i

cor. També estan presents en àrees cerebrals específiques: hipotàlem, òrgans circumventriculars, nucli supraquiasmàtic, nucli supraòptic, nucli paraventricular i el nucli del tracte solitari, en el qual està implicat en l'alliberament de la vasopresina i del control neurogènic de la PA (139,140).

Els receptors AT2R estan localitzats principalment al cervell, sobretot a àrees de control i aprenentatge de l'activitat motora, així com a les àrees sensorials i visuals i al sistema límbic (141). Els receptors AT2R son particularment abundants als fetus, on mostren un patró d'expressió transitori, d'aquí que s'hipotetitzi el seu paper en el desenvolupament (142-144).

La majoria dels efectes de l'angiotensina II (com a vasoconstrictora i com a factor de creixement) estan mediat per l'AT1R, mentre que l'AT2R tindria un efecte contrari antiproliferatiu i promotor de la diferenciació cel·lular (145). Les diferències en les respostes de proliferació cel·lular són degudes a que l'AT1R estimula la fosforilació de proteïnes, mentre que l'AT2R produeix defosforilació de proteïnes. L'AT2R estimula la vasodilatació i la natriuresi mitjançant una cascada autocrina incloent la bradicinina, òxid nítric i el GMP cíclic (146).

1.2.6 ALDOSTERONA

Dins del SRAA, a més a més de l'angiotensina II, estudis recents atribueixen a l'aldosterona efectes fibrogenètics molt importants. Aquests estudis mostren que en rates on s'ha frenat la proteïnúria, la HTA i la NAS mitjançant l'administració simultània d'ARA-II i d'IECA, l'administració d'aldosterona en infusió augmenta la severitat de l'afecció renal fins al nivell de les rates no tractades (147). Aquestes dades suggereixen que l'aldosterona pot exercir efectes fibrogènics independents de l'angiotensina II. Aquesta acció de l'aldosterona es troba recolzada per una sèrie d'evidències experimentals i clíniques que suggereixen una possible acció de l'aldosterona en l'etiopatogènia de la

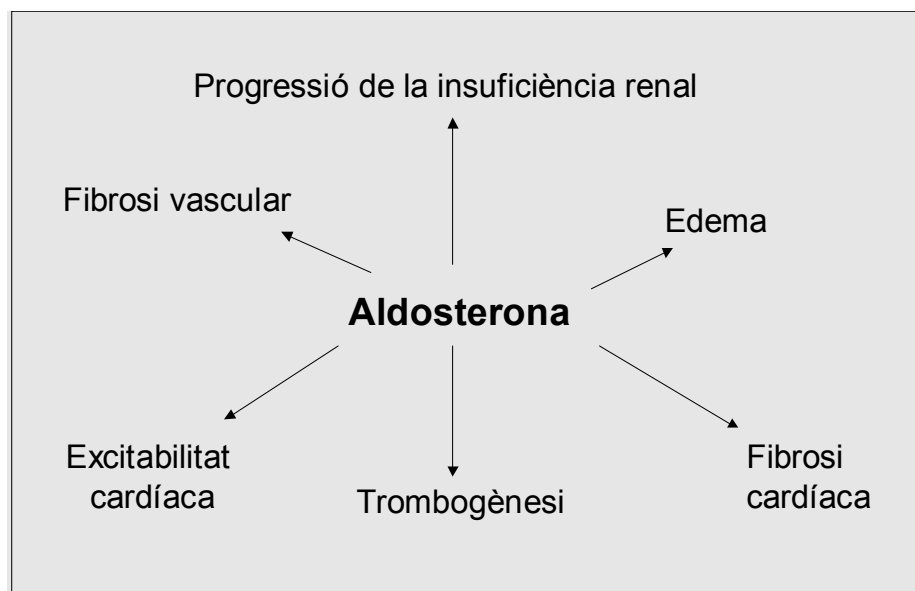


Figura 4. Accions de l'aldosterona (148).

progressió de la IR, efectes, que serien independents dels efectes coneguts de retenció de Na⁺ i vasoconstricció implicats en la HTA.

En primer lloc és coneguda l'acció fibrogènica i hipertròfica dels mineralcorticòids sobre el miocardi, i que la consegüent administració d'espironolactona mitigarà la hipertròfia cardíaca (149,150).

En l'aspecte renal hi ha estudis que objectiven un augment del col·lagen tipus IV quan s'incuben cultius de cèl·lules mesangials amb aldosterona (151).

A nivell clínic s'ha trobat una correlació significativa entre nivells d'aldosterona plasmàtica i velocitat de caiguda de la funció renal en un estudi longitudinal en pacients diabètics amb nefropatia (152).

Altres estudis han objectivat un increment dels nivells sèrics d'aldosterona en pacients amb IRC (153,154).

A nivell experimental hi ha estudis que comparen dany renal entre rates amb 1/3 de la massa renal funcionant i adrenalectomia sense administració de tractament substitutiu amb mineralcorticòids (solament glucocorticoids) i rates amb 1/3 de massa renal funcionant i sense

adrenalectomia, objectiven menor lesió renal a les primeres (155).

En el model de rates “deoxicorticosterone acetate-salt hypertensive” l’administració de mineralcorticòids induïa lesions de NAS maligna i accident vascular cerebral (AVC)(156); el desenvolupament d’aquestes lesions és degut probablement a l’acció intrínseca dels mineralcorticòids degut a que aquestes rates mostraven nivells baixos d’activitat renina plasmàtica i responien poc al tractament amb IECA.

Altres estudis objectiven que l’administració d’heparina produeix protecció contra el dany renal en rates amb 1/3 de massa renal funcionant, podent-se atribuir aquest efecte a la supressió de l’aldosterona per l’heparina (157).

Finalment hi ha estudis que demostren que la inhibició dels receptors dels mineralcorticòids de rates amb espironolactona atenuen la proteinúria de forma important, posteriorment l’estudi histològic demostrava menys lesions en el grup tractat amb espironolactona que en el grup placebo (158).

1.2.7 TRACTAMENT AMB FARMACS INHIBIDORS DEL SRAA

1.2.7.1 Inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina (IECA)

Actualment hi ha una clara evidència, basada en estudis prospectius randomitzats, de l'efecte renoprotector dels IECA, independent del seu efecte hipotensor, en nefropatia diabètica i no diabètica (159).

A la nefropatia diabètica, la renoprotecció dels IECA s'ha objectivat en pacients amb DM-1 i DM-2 amb microalbuminúria, i en pacients amb DM-1 amb nefropatia desenvolupada. L'evidència de la renoprotecció amb IECA en els pacients amb DM-2 amb nefropatia desenvolupada és menys clara, tot i que s'han descrit molts casos d'estabilització de la funció renal i revertiment de la síndrome nefròtica amb DM-2.

A la nefropatia no diabètica els IECA han demostrat tenir un efecte renoprotector, independent del seu efecte en el control de la PA, però solament en pacients amb proteïnúria de rang nefròtic (160). No obstant, ajustant pels efectes sobre el control de la PA en la pèrdua de la funció renal, proporciona evidència de que els IECA són renoprotectors independentment del control de la PA a les nefropaties amb nivells menors de proteïnúria (de 1 a 3g) (4,161).

La renoprotecció aportada pels IECA pot ser duradora. A la nefropatia diabètica (162,163) i a la nefropatia no diabètica (164), el seguiment de 5 fins a 10 anys ha mostrat una remissió de la síndrome nefròtica mantinguda i una funció renal estable o amb una certa tendència a millorar en alguns pacients.

1.2.7.2 Antagonistes del Receptor de l'angiotensina 2 (ARA-II)

Aquests fàrmacs són antiproteinúrics i hipotensors d'una manera similar als IECA (165). Els ARA II tenen un perfil favorable en quant als efectes secundaris, comparat amb els IECA els ARA-II produeixen menys tos, angioedema o hiperkalièmia. Els ARA II s'han demostrat eficients com a renoprotectors en els pacients amb DM-2 i nefropatia oberta (166).

1.2.7.3 Combinació de ARA II amb IECA

La combinació d'aquests agents té avantatges teòriques degut a que el tractament solament amb IECA o ARA II té dèficits terapèutics.

En quant als IECA, el dèficit prové de que una part de l'angiotensina II generada és formada per una cimasa que no s'inhibeix pels IECA (167).

El tractament amb ARA II no presenta aquest dèficit perquè actua directament sobre el receptor tipus 1 (AT1R) de l'angiotensina II. Però d'una altra banda, els ARA II no inhibeixen la degradació de la

bradicinina (cosa que sí fan els IECA), i la bradicinina pot tenir un important efecte hipotensor (167). A més a més, els ARA II no suprimeixen d'una manera significativa la producció d'aldosterona, mentre que sí que ho fan els IECA (168). Donat que l'aldosterona indueix fibrosi tisular (169), els tractaments amb IECA que suprimeixen l'aldosterona tenen un avantatge terapèutic.

Finalment dir que la teràpia combinada d'IECA amb ARA II fa que sigui més eficient donat que la formació d'angiotensina II que no pot ser inhibida totalment pels IECA acaba sent inhibida a nivell del receptor. En aquest sentit, un estudi petit en pacients amb nefropatia IgA, va objectivar que el tractament combinat IECA/ARA II era més efectiva reduint la proteïnúria que cada tractament per separat, malgrat aconseguir nivells de PA similars (170).

1.2.7.4 Tractament amb inhibidors de l'aldosterona

Inicialment es podria suposar que els efectes adversos de l'aldosterona podrien mitigar-se amb el simple bloqueig de la síntesi d'aldosterona amb IECA o ARA-II. Però s'ha vist que l'ús d'IECA inicialment causa una disminució aguda de la concentració d'aldosterona, però que en un

us continuat aquesta supressió no es manté (171-174). Per aquest motiu s'ha proposat que l'ús d'antagonistes del receptor de l'aldosterona juntament amb IECA podria tenir un benefici addicional en la prevenció del dany orgànic terminal (171,172). Les limitacions del tractament amb antagonistes del receptor de l'aldosterona són la *hiperkalièmia*, la *ginecomàstia i la impotència* en homes i de *transtorns menstruals* en dones premenopàusiques.

Per aquest motiu s'ha investigat un antagonista selectiu del receptor de l'aldosterona anomenat *esplerenona*. Aquest nou fàrmac produeix un bloqueig efectiu de l'aldosterona sense els efectes secundaris sexuals. Hi ha estudis en models animals que han mostrat que l'esplerenona prevén l'aparició de proteïnúria i lesions renals en el model "saline-drinking SHRSPS" (175). També en un altre model animal: model de rates amb estenosi aòrtica ascendent, els animals tractats amb esplerenona mostren una menor hipertròfia del ventricle esquerre (HVE) respecte als animals no tractats (176).

El tractament amb antagonistes del receptor de l'aldosterona podria presentar limitacions en situacions d'hipoaldosteronisme. En aquest sentit hi ha estudis recents que han demostrat que alguns individus d'edat avançada amb IR moderada desenvolupen hipovolèmia lleu i tendeixen a tenir nivells plasmàtics baixos d'aldosterona. Aquestes disminucions dels nivells de l'aldosterona podrien fer que els fàrmacs

antagonistes del receptor de l'aldosterona fossin menys efectius, però això no és així per 2 motius:

1. Existència de síntesi extrarrenal d'aldosterona a nivell de l'endoteli i de les cèl·lules de la musculatura llisa vascular, mostrant una evidència directa de que les cèl·lules vasculares de per sí són aldosterogèniques (177,178).
2. La resposta a l'aldosterona pot estar dissociada dels nivells circulants d'aldosterona. En aquest sentit Horiuchi et al van demostrar un increment de la concentració dels receptors dels mineralcorticòids en els ronyons de M-SHRSPS en els quals el desenvolupament de NAS succeeix sense una càrrega de sal, suggerint que un augment de la resposta als mineralcorticòids pot succeir en absència d'un augment en els nivells circulants d'aldosterona (179).

1.3 FACTORS DE CREIXEMENT

1.3.1 FIBROGÈNESI

Donat que el SRAA no exerceix un efecte protector total en la progressió de la nefropatia és probable que altres factors siguin importants en la gènesi i progressió de la IR.

La patologia crònica de la majoria de teixits com el ronyó, fetge, pulmó, cor, medul·la òssia i pell es caracteritza per una fibrosi progressiva amb pèrdua lenta de la seva funció. La fibrogènesi no s'ha d'entendre únicament com un procés patològic sinó com un excés en els processos biològics que intervenen en la reparació dels teixits (180). El principal event en la reparació normal dels teixits és l'augment de les citocines en resposta al dany tisular. La majoria d'estudis i evidències científiques apunten al TGF- β com a la citocina clau que inicia i finalitza la reparació tisular i que la seva producció mantinguda provoca el desenvolupament de la fibrosi tisular (181).

1.3.2 CITOCINES EN EL DANY TISULAR

Els teixits estan constituïts per grups organitzats de cèl·lules envoltades per una MEC i per una xarxa de vasos sanguinis. L'homeostasi tisular es manté mitjançant la coordinació del creixement cel·lular i la proliferació amb la producció i recanvi de la MEC. Les cèl·lules aconsegueixen aquesta coordinació mitjançant l'activitat autocrina i paracrina d'uns polipèptids anomenats citocines, també coneguts com a factors de creixement (182).

Les citocines es diferencien de les hormones normals en que actuen a nivell local i no a distància. L'acció de les citocines pot ser positiva o negativa (183). Les citocines regulen tots els aspectes del remodelatge tisular, ja sigui planificat (en el cas de l'embriogènesi i el desenvolupament) o no planificat (carcinogènesi, reparació tisular després del dany tisular) (184,185).

1.3.3 TGF- β

El TGF- β és una citocina multifuncional que es va aïllar de les plaquetes i es va caracteritzar fa uns 18 anys (186). Als mamífers el TGF- β té tres isoformes i les seves propietats biològiques són gairebé idèntiques. El

gen del TGF- β està regulat en resposta al dany tisular i el TGF- β 1 és la isoforma més implicada a la fibrosi.

El TGF- β 1 es sintetitza com una molècula precursora de 391 aminoàcids i per proteolisi allibera fragments peptídics i una subunitat de 112 aminoàcids. El TGF- β 1 actiu és una proteïna dimèrica de 25kD composta de 2 subunitats unides per un enllaç disulfid. El TGF- β 1 es secreta en una forma inactiva (latent) que requereix activació abans de fer el seu efecte biològic. La forma latent del TGF- β 1 és un complex d'elevat pes molecular en el qual el TGF- β 1 està unit de forma no covalent a un altre pèptid dimèric. El TGF- β 1 latent s'emmagatzema a la superfície cel·lular i a la MEC és convertit a TGF- β 1 actiu per un mecanisme desconegut. El TGF- β 1 s'uneix a 3 proteïnes de membrana: els receptors tipus I, II i III que es troben a la majoria de les cèl·lules.

Els receptors tipus I i II són serin-treonin-cinases transmembrana que interactuen entre elles i faciliten les seves senyalitzacions (187). El receptor tipus III (també anomenat β -glican) és un proteinglican ancorat a la membrana que actua presentant el TGF- β 1 als altres receptors (188).

Els efectes del TGF- β 1 en la síntesi i dipòsit de la MEC estan mediatos pels receptors tipus I, mentre que els efectes en el creixement cel·lular i en la proliferació estan mediatos pel receptor tipus III.

La regulació de la secreció i activació del TGF- β 1 inclou complexos processos post-transcripcionals, incloent l'estabilització del ARNm, l'ensamblatge i activació del complex TGF- β 1 latent i la modulació de l'expressió del receptor (189).

Altres citocines que intervien amb el TGF- β 1 en la reparació tisular són el PDGF, bàsic fibroblast growth factor, tumor necrosis factor i la interleukina-1 (180).

1.3.4 ACCIONS BIOLÒGIQUES DEL TGF- β 1 EN LA REPARACIÓ TISULAR

Les plaquetes alliberen el TGF- β al lloc del dany tisular. Per reparar el dany tisular, el TGF- β induïx el dipòsit de la MEC estimulant simultàniament la producció de noves proteïnes de la matriu (fibronectines, col·làgens i proteoglicans), bloquejant la degradació de la matriu, disminuint la síntesi de proteases i augmentant la síntesi dels

inhibidors de les proteases, i modulant l'expressió d'integrines de la superfície cel·lular de forma que augmenta la interacció cèl·lula-matriu i l'ensamblatge de la MEC (190). El TGF- β 1 també indueix la seva producció per les cèl·lules, amplificant els seus efectes biològics (191). En la reparació tisular normal, la producció de TGF- β 1 i de la MEC finalitza per mecanismes desconeguts de forma que el teixit danyat es cura. Els pacients amb una patologia crònica, un defecte en la regulació del TGF- β 1, el dany tisular repetit o ambdues coses, condueixen cap a la producció contínua de TGF- β 1 i MEC, conduint cap a la fibrosi tisular.

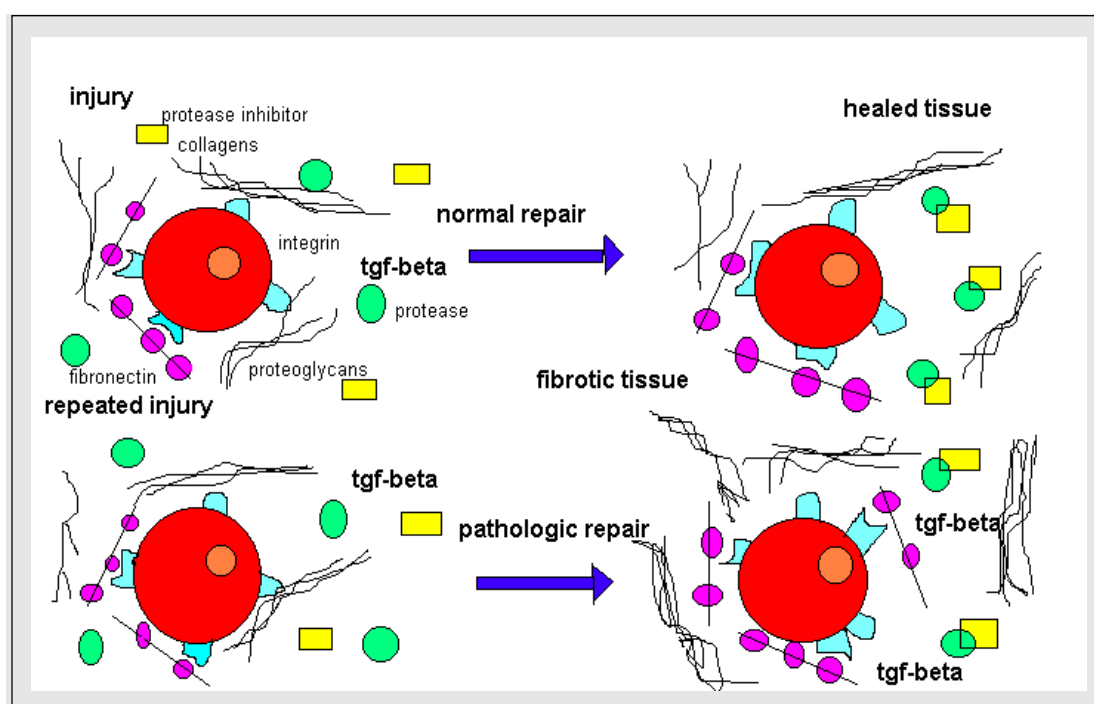


Figura 5. Increment de la producció de TGF- β a la fibrogènesi. En la reparació tisular normal, la producció de TGF- β i de la MEC finalitza per mecanismes desconeguts de forma que el teixit danyat es cura. En pacients amb patologia crònica, la repetició del dany tisular, un defecte en la regulació de TGF- β , o ambdues condueixen a una producció contínua de TGF- β i de MEC, resultant en la fibrosi tisular (192).

1.3.5 TGF- β 1 EN LA PATOLOGIA RENAL

En els animals la sobreexpressió de TGF- β 1 mitjançant la injecció endovenosa, transferència genètica transitòria o inserció transgènica ha mostrat que el ronyó és susceptible a la fibrosi ràpida (193). En patologia humana s'ha demostrat un augment de la producció de TGF- β 1 a GN, nefropatia diabètica, NAS i nefropatia de l'empelt (12,13). Hi ha estudis que atribueixen un paper clau del TGF- β 1 en el desenvolupament de la fibrosi intersticial i de l'endarteritis proliferativa

en el rebuig crònic de l'empelt renal i en la nefrotoxicitat per cyclosporina A (194). S'ha vist que hi ha un augment de TGF- β 1 i síntesi de proteïnes de la matriu en animals d'experimentació amb rebuig crònic de l'empelt renal (195).

Aquesta dada és important per que fins al moment actual no hi ha cap tractament efectiu capaç d'aturar la pèrdua progressiva de la funció renal associada a la nefropatia crònica de l'empelt.

1.3.6 ANTAGONISTES DEL TGF- β I AGENTS ANTIFIBRÒTICS

Injectant un antisèrum capaç de neutralitzar l'activitat del TGF- β 1 s'inhibeix la seva acció al ronyó, pell, pulmó, cervell, articulació i paret arterial (196-201). El Receptor soluble tipus III del TGF- β 1 inhibeix la

unió del TGF- β 1 als seus receptors de membrana i bloqueja la seva acció; els receptors solubles tipus I i II del TGF- β 1, que tenen majors afinitats pel TGF- β 1, podrien ser més potents en el bloqueig d'aquesta acció (191,202). El pèptid associat al TGF- β 1 latent que incrementa en processos d'activació del TGF- β 1 podria ser usat per inhibir l'acció del TGF- β 1 (192). Hi ha diferents membres de la superfície del receptor retinoids-esteroids que poden actuar com a reguladors post-transcripcionals pels gens de les diferents isoformes del TGF- β 1. La manipulació d'aquesta regulació pot induir una disminució de la producció de TGF- β 1 (203). Una altra possibilitat és utilitzar oligonucleòtids TGF- β 1-antisense. Una dieta baixa en proteïnes disminueix l'expressió del TGF- β 1 a les rates amb GN aguda (204). Finalment els proteoglicans (dacorin i biglican) que s'uneixen al TGF- β 1, són capaços d'inhibir la seva acció. Donat que la producció d'aquests proteoglicans està induïda pel TGF- β 1, s'ha suggerit podrien ser els reguladors naturals de l'acció del TGF- β 1 (205).

1.4 INTERACCIONS ENTRE EL SRAA I EL TGF- β 1

Una possible explicació de la particular susceptibilitat renal a la fibrosi pot ser el recent descobriment de les complexes interaccions entre el SRAA i el TGF- β 1.

La força de fregament intravascular, deguda a un augment de la pressió o el flux, augmenta l'expressió de TGF- β 1 i activa el SRAA a les cèl·lules endotelials (206). La deplecció de volum i la restricció de potassi són estímuls coneguts de la producció de renina i també augmenten la producció de TGF- β a l'aparell juxtaglomerular (85,207). D'aquí ve que la hipokalèmia crònica pot provocar IR.

L'increment de TGF- β i de renina i angiotensina II produeix, d'una banda vasoconstricció i hipertròfia cel·lular i de l'altra, un augment de l'aldosterona amb un augment de la reabsorció de sodi que acabaria produint hipertensió i fibrosi renal. Quan es bloqueja el SRAA amb enalapril es produeix un increment de la renina i també del TGF- β a l'aparell juxtaglomerular indicant que la producció de renina i també del TGF- β està corregulada (208). Com s'ha dit, l'angiotensina II indueix fortament la producció de TGF- β i incrementa la seva activació en cultius cel·lulars i in vivo (127,133). A més l'angiotensina II també estimula la producció del PAI-1 independent del TGF- β 1 impeding la degradació de la matriu (209).

Tots els avanços que es van produint en el coneixement de la progressió de la IR han de tenir la finalitat d'arribar a aconseguir un tractament efectiu que aturi i/o alenteixi la progressió de la nefropatia. Així, essent el TGF- β una citocina clau en el procés de fibrosi renal, els seus nivells plasmàtics post-administració d'un IECA o un ARA-II romanen elevats en molts casos i paral·lelament a una considerable persistència de nefropatia (210,211). Per tant sembla que la inhibició del SRAA és insuficient per evitar la progressió de la fibrosi renal, i probablement l'administració conjunta d'un inhibidor del SRAA a un agent que suprimeixi el TGF- β pot ser superior a l'inhibidor del SRAA aïllat.

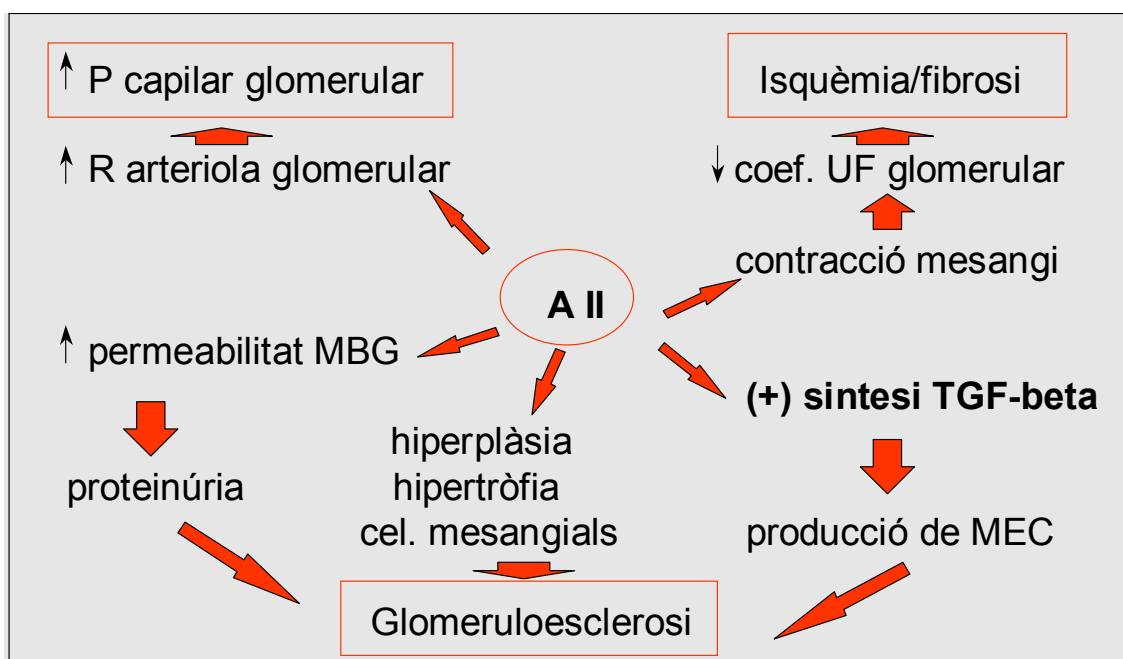


Figura 6. Accions glomerulars hemodinàmiques i no hemodinàmiques de l'angiotensina II i les seves interaccions amb el TGF- β (212).

1.5 FACTORS GENÈTICS I PROGRESSIÓ DE LA INSUFICIÈNCIA RENAL

1.5.1 EVIDÈNCIES EXPERIMENTALS:

S'ha vist que animals transgènics que expressen un gen renina addicional mostren un empitjorament més ràpid de la funció renal respecte als que no tenen el gen addicional, malgrat presentar uns nivells de PA similars (102). A més, estudis genètics recents han demostrat que la transferència de gens humans d'angiotensinògen i renina a ronyons de rates indueix esclerosi glomerular (103). També cal destacar l'estudi en rates "fawn-hooded" en que es demostrà l'existència de dos gens, el gen Rf-1 i el gen Rf-2, responsables de la meitat de la variabilitat genètica respecte a l'empitjorament de la funció renal; i un tercer gen, el Bpfh-1, responsable del 26% de la variabilitat genètica respecte a la PA. Es demostrà que Rf-1 afectava fortament el risc d'empitjorament renal sense tenir efecte en la PA, suggerint que la susceptibilitat al dany renal i a la HTA es troben sota control genètic independent en aquesta cepa de rates (213).

1.5.2 EVIDENCIES CLINIQUES:

Fins fa relativament poc temps, la rellevància de factors genètics per patologia renal progressiva estava limitada a malalties produïdes per un únic gen amb herència mendeliana, tals com la PQR o la malaltia d'Alport. Però cada cop hi ha més evidències de que la IRC és una patologia complexa en la que hi intervenen múltiples gens. L'associació familiar de la nefropatia diabètica i d'altres nefropaties (GN membranosa, nefropatia IgA, i glomeruloesclerosi segmentaria i focal) amb diferents patrons de HLA (214-217), suggereixen que la susceptibilitat per desenvolupar aquestes patologies és deguda a influències genètiques.

D'una altra banda, la HTA, la hiperlipidèmia i la DM afecten a centenars de milions de gent arrel del món. Però curiosament, pacients amb la mateixa condició poden desenvolupar complicacions ben diferents (IRT, cardiopatia isquèmica, AVC) o no presentar-les. La causa d'aquesta variabilitat és desconeguda, però una hipòtesi cada cop més plausible és l'existència de factors genètics que determinen o influencien el patró de complicacions que desenvoluparà el pacient. En aquest sentit, cada cop hi ha més estudis que demostren que a diferents malalties renals hi ha una susceptibilitat genètica que afavoreix que la IR progressi malgrat un

bon control de la PA i de l'administració d'IECA (amb el seu efecte antiproteïnúric i nefroprotector) (3,4). Alguns estudis han demostrat una forta associació entre un historial familiar d'IRT i un risc elevat d'IRT, suggerint un component genètic en aquesta patologia (218). A més, l'expressió dels gens del SRAA es troba regulada en part per polimorfismes genètics freqüents a la població general. Així mateix, la recerca d'una associació entre polimorfismes genètics en gens candidats i desenvolupament d'IRT s'ha iniciat en els darrers anys. La progressió de la IR (tal i com ja he explicat prèviament) està influenciada per la interacció entre múltiples factors genètics, factors mediadors del dany i factors predisponents.

Donat que el SRAA es troba implicat en la HTA, la qual és una de les principals causes implicades en la progressió de la IR i també una conseqüència del dany renal; els primers estudis genètics aplicats al camp de la HTA es van fer sobre els diferents components d'aquest sistema. Així, es van començar a fer estudis de polimorfismes dels diferents gens del SRAA en individus amb HTA essencial, en afectació d'òrgan diana per la HTA i finalment en presència de nefropatia de qualsevol etiologia i progressió cap a la IRT, com ja explicaré més endavant.

1.5.3 DEFINICIÓ DE POLIMORFISME:

Un polimorfisme és un canvi en la seqüència de l'àcid desoxirribonucleic (ADN), i es defineix com aquella variació genètica detectable en almenys l'1% de la població, aquesta variació genètica dóna lloc als diferents al·lels que són les possibles formes alternatives d'un determinat gen. Un polimorfisme pot influir o no en el fenotip, on pot constituir un marcador d'utilitat clínica. Els polimorfismes es poden produir a regions codificants dels gens (o exons) o en les no codificants (o introns).

S'ha vist que hi ha polimorfismes que tenen importància en la predisposició cap al desenvolupament de malalties d'herència mendeliana (fibrosi quística, distròfies musculars hereditàries, etc.), de tumors (adenocarcinoma de colon, retinoblastoma, tumor de Wilms), i en patologies amb patrons hereditaris complexes tals com la DM, la HTA i l'aterosclerosi.

Els llocs del genoma humà on és més fàcil que es produeixin els polimorfismes són les zones on es produeix la repetició d'una seqüència curta d'ADN varies vegades. Aquestes seqüències poden ser tant curtes

com 2 parells de bases o tant llargues com cents de parells de bases (també anomenades microsatèl·lits).

Un polimorfisme pot resultar d'una mutació puntual, d'una inserció de ADN, d'una delecció o de la variació d'una seqüència repetida del gen o a prop d'ell. Els tres primers tipus de polimorfismes són bial·lèlics i succeeixen al ADN intrònic o frontera més que al ADN codificant, que sol estar més conservat. Un polimorfisme bial·lèlic cal que sigui prevalent amb una freqüència del 30 al 50% per cada al·lel. Cada microsatèl·lit té tres o més al·lells, per tant són marcadors més informatius pels estudis genètics.

Per mesurar la longitud dels polimorfismes a la seqüència del ADN hi ha fonamentalment dues tècniques: la reacció en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR) i la tècnica del Southern Blotting. La PCR s'usa més quan hi ha variacions de seqüències curtes de dos, tres o quatre parells de bases, mentre que el Southern Blotting s'usa més quan hi ha variacions en la longitud del ADN de cents o mils de parells de bases. La PCR utilitza "primers" (oligonucleòtids) que es fixen als dos punts que flanquegen el polimorfisme, mentre que al Southern Blotting la localització d'aquests dos punts es fa mitjançant la digestió amb enzims de restricció de les zones que flanquegen la seqüència repetitiva.

En aquest estudi els polimorfismes avaluats s'han analitzat mitjançant la tècnica de la PCR.

La tècnica de la PCR és un mètode "in vitro" per a la síntesi enzimàtica de freqüències específiques d'ADN, utilitzant dos oligonucleòtids de 15-25 bases (anomenats cebadors) que hibriden en hebres i flancs oposats del fragment d'ADN a amplificar.

Aquest procés es realitza mitjançant cicles en els que es modifica la temperatura. Cada cicle es divideix en 3 passos:

1. Desnaturalització de l'ADN (separació de les 2 hebres, elevant la temperatura fins als 95°C)
2. Unió dels cebadors a les seves seqüències complementàries per descens de la temperatura
3. Adequació de la temperatura perquè pugui actuar la polimerasa i d'aquesta forma sintetitzar el fragment de ADN que interressi.

A cada cicle s'obtenen el doble de cadenes que al cicle anterior. En el supòsit d'haver començat amb una sola cadena doble de ADN, després de 20 cicles es disposaria d'un milió de còpies del fragment amplificat (219).

L'enzim utilitzat per la PCR és l'ADN polimerasa (Taq). Per a fer la PCR d'un determinat fragment d'ADN, cal conèixer com a mínim la seqüència dels dos extrems del fragment. Coneixent aquestes seqüències nucleotídiques es sintetitzen els dos oligonucleòtids o cebadors (un per cada flanc i hebra), de forma que s'uneixen a l'ADN, formant-se un fragment de doble cadena a cada hebra. A partir d'aquí la Taq polimerasa pot sintetitzar les cadenes complementàries en direcció 5'-3'. La solució en la que es realitza la PCR ha de contenir bàsicament: Tris.HCl, MgCl₂, els quatre deoxinucleòtids (dNTP), els cebadors i l'ADN mostra.

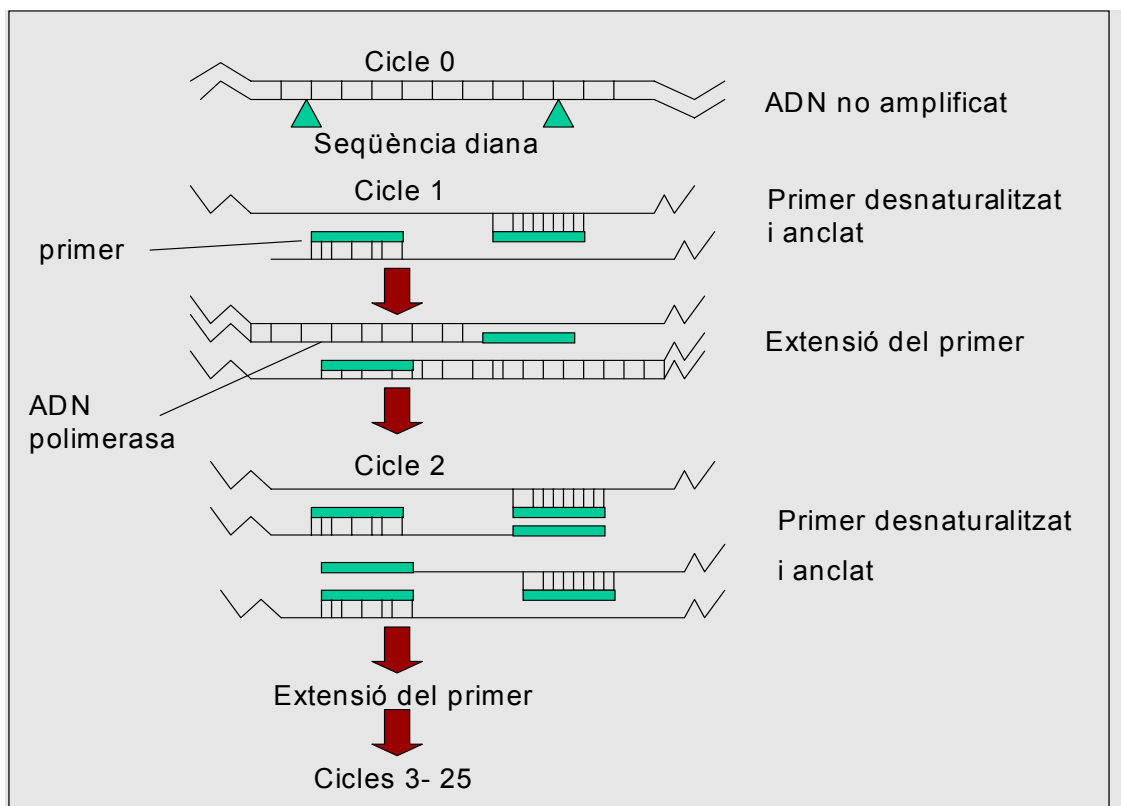


Figura 7. Cicles de la PCR. Un cop separades les cadenes, els cebadors s'uneixen a les seves regions específiques, permetent la síntesi de noves cadenes de ADN.

1.5.4 TIPUS D'ESTUDIS GENÈTICS EN HTA/IR CRÒNICA

Per identificar els gens que intervenen en malalties poligèniques, del tipus HTA o IRC, hi ha 2 tipus d'estratègies: els estudis de lligament i els anàlisi d'associació o transversals (220)

- Els estudis de lligament: Analitzen la freqüència de genotips en membres de famílies afectes i no afectes. Els estudis de pedigrees abarquen varies generacions de cara a generar resultats estadísticament significatius. Això és difícil en una malaltia com la HTA o la IRC. Un altre enfoc és l'estudi de parells de germans o *Anàlisi sib-par*, el qual compara el número d'al·lels compartits per descendents afectats pel fenotip que s'estudia. S'usen preferentment microsatèl·lits.
- Estudis d'associació cas-control: consisteixen en la comparació de la freqüència de genotips de polimorfismes (o variants d'al·lels) dels gens candidats entre pacients amb HTA o pacients amb IRC i població normotensa o amb normofunció renal de control. La selecció de les cohorts pot ser transversal o longitudinal. Com a requeriments cal que el gen s'hagi clonat, i com a mínim cal un polimorfisme conegut del gen. La part més important d'aquest tipus d'estudi és la selecció de

pacients i controls. Cal que siguin de la mateixa raça, el més similar possibles genèticament i en quant a edat, sexe, etc. Les freqüències dels al·lels estudiats al grup control han de ser similars a les freqüències reportades en poblacions de la mateixa raça. A més, és imperatiu que les freqüències observades del genotip no siguin significativament diferents d'aquelles esperades segons la fórmula

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

on p i q són la freqüència de cada al·lel del polimorfisme estudiat, i això ens mostra que el grup a estudiar es troba en l'*Equilibri de Hardy-Weinberg*. És a dir que no hi ha esbiaixament a la mostra o població a estudi, que està ben barrejada genèticament.

Els anàlisi d'associació cas-control són molt potents i es basen en el concepte del desequilibri de lligaments, que interpreta que l'associació d'al·lels a diferents locus no és per atzar, de forma que qualsevol diferència detectada és deguda a la coherència d'una variació al·lèlica al locus proper (fortament lligat) que influeix en la susceptibilitat de patir la malaltia. Cal a dir en aquest sentit, que els nostres estudis són d'associació.

Els estudis d'associació poden ser:

1. Directes: Quan la variació és causa de la malaltia; són polimorfismes funcionals.

-
2. Indirectes: La variació no és funcional però és marcador d'una variant a prop (no coneguda) que no causa la malaltia.

1.5.5 GEN DE L'ANGIOTENSINOGEN: POLIMORFISME M235T

A l'home hi ha diversos fets que apunten cap a una relació estreta entre l'angiotensinògen i la PA, com són la correlació significativa entre les concentracions plasmàtiques d'angiotensinògen i la PA (221), les altes concentracions plasmàtiques d'angiotensinògen en individus amb HTA i en els fills d'hipertensos respecte als individus normals (222), els nivells plasmàtics elevats d'angiotensinògen en adults joves hipertensos, fills de pares hipertensos (222), el descens o elevació de la PA en relació a l'administració d'anticossos antiangiotensinògen o d'angiotensina (223,224), l'expressió del gen de l'angiotensinògen en teixits directament implicats en la regulació de la PA (225), i l'elevació de la PA en animals transgènics amb sobreexpressió d'angiotensinògen (226,227).

El gen de l'angiotensinògen humà es localitza al cromosoma 1q42-43 (228). S'han trobat quinze polimorfismes al llarg del gen de l'angiotensinògen localitzats a l'exó 2 i 3. Dues variants polimorfiques del gen de l'angiotensinògen, el polimorfisme T174M i el polimorfisme M235T, són les que han mostrat associacions amb fenotips.

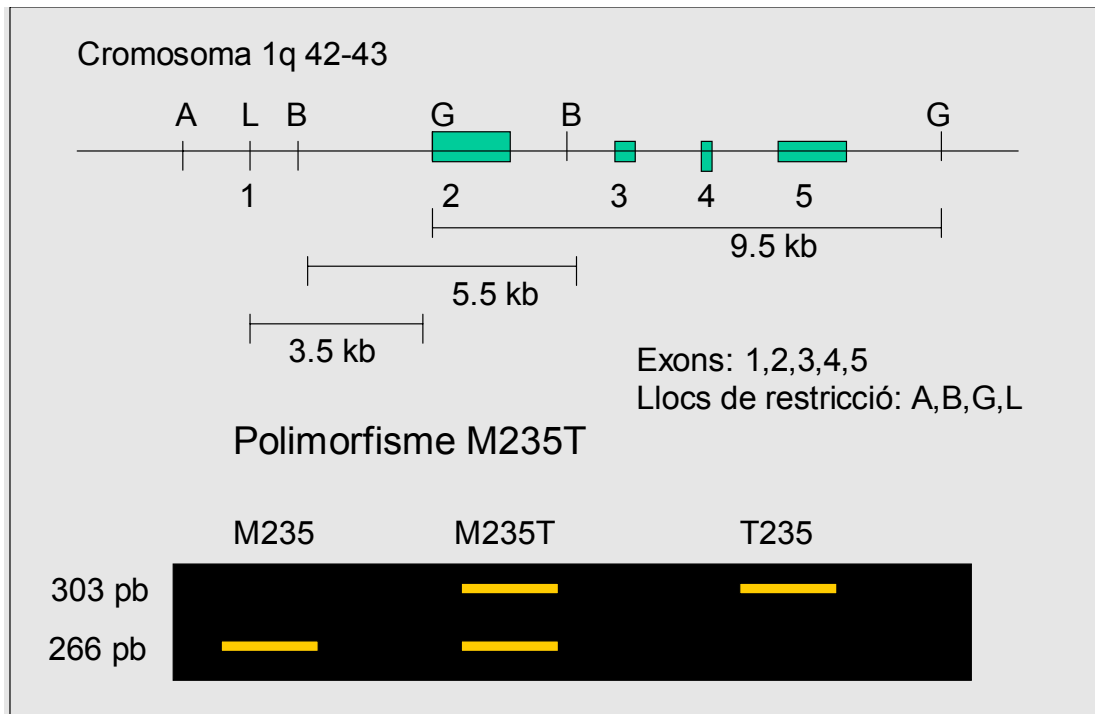


Figura 8. Estructura del gen de l'angiotensinògen, localitzat al cromosoma 1q42-43. Imatge de les bandes corresponents als diferents genotips del polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinogen (229).

La variant polimòrfica T174M, consistent en una substitució d'una treonina per una metionina a nivell del codó 174, es troba associada a la HTA (230).

La variant polimòrfica M235T, consisteix en una transició T→ C al nucleotid 704 a l'exó 2, que resulta en una substitució d'una metionina per una treonina a nivell del codó 235, s'ha associat a:

-
- Nivells plasmàtics elevats d'angiotensinogen amb el genotip TT vs MM (230,231), que pot ser el resultat d'un augment en la síntesi o d'una alteració en la seva reacció amb la renina.
 - Inici precoç de la HTA (232) i nivells de PA més elevats en pacients amb nefropatia diabètica (233), relacionat amb el genotip TT.
 - Patologia coronària (234), relacionat amb el genotip TT.
 - Progressió més ràpida cap a la IRT en pacients amb nefropatia IgA (235), relacionat amb l'al·lel T.

1.5.6 GEN DE L'ECA: POLIMORFISME I/D

A l'home s'ha demostrat la presència d'una variant del gen de l'ECA que consisteix en la presència (inserció) o absència (delecció) de 287 parells de bases a l'intró 16 del cromosoma 17. Els genotips resultants són tres: el genotip DD (homozigot per la delecció), el genotip II (homozigot per la inserció), i el genotip DI que correspon a l'heterozigot (236,237). Els primers treballs realitzats investigant aquesta variant van observar que aquest polimorfisme podia explicar entre un 30 i un 40% de la variabilitat dels nivells plasmàtics de l'ECA a la població normal. Així, el genotip DD s'associa amb nivells plasmàtics més elevats, postulant-se que podria intervenir en una major conversió d'angiotensina I a angiotensina II. (236,237).

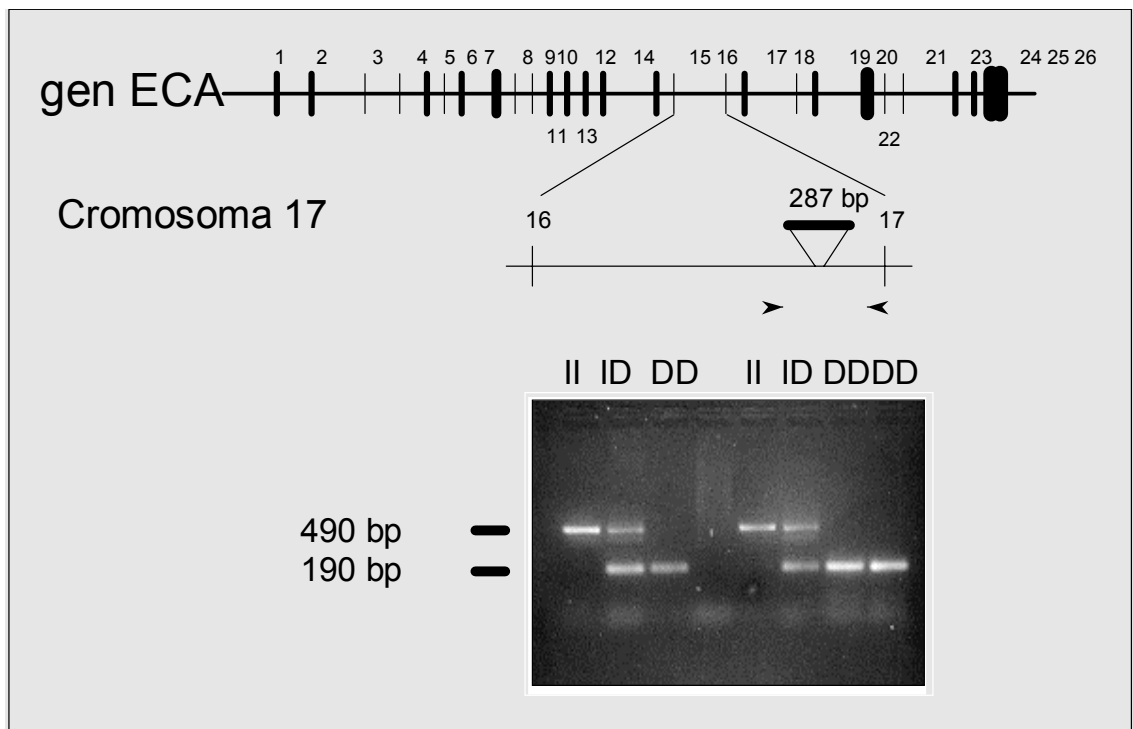


Figura 9. Gen de l'ECA. Localització del polimorfisme I/D de l'ECA. Imatge dels diferents genotips del polimorfisme I/D del gen de l'ECA (238).

Fenotips associats al polimorfisme I/D de l'ECA:

- Relació amb la HTA: Hi ha treballs que demostren una associació entre el genotip DD de l'ECA i la presència de HTA (239-241), però hi ha d'altres estudis en que aquesta associació no s'ha trobat (242-244). També hi ha algun estudi que troba aquesta associació entre el genotip DD i la HTA en homes, però no en dones (245). Una possible explicació per a aquesta variabilitat en els resultats pot ser degut a que no existeix una relació entre el gen de l'ECA i la PA, tot i que probablement és degut a l'heterogeneïtat genètica de la població

estudiada, així com la pròpia heterogeneïtat de la HTA.

- Relació amb patologia cardiovascular (CV): el polimorfisme DD de l'ECA s'ha associat a un elevat risc d'infart de miocardi (IAM), a la HVE, a la miocardiopatia dilatada, aterosclerosi carotídea i AVC (246-250). Altres estudis no ho han trobat (234).
- Associació a una major predisposició al dany renal i progressió de la nefropatia en DM, HTA, nefropatia IgA i PQR (251-254).

1.5.7 GEN DEL RECEPTOR DE L'ANGIOTENSINA II (AT1R)

El gen que codifica l'AT1R es troba localitzat al cromosoma 3 a la regió 3q21-q25.

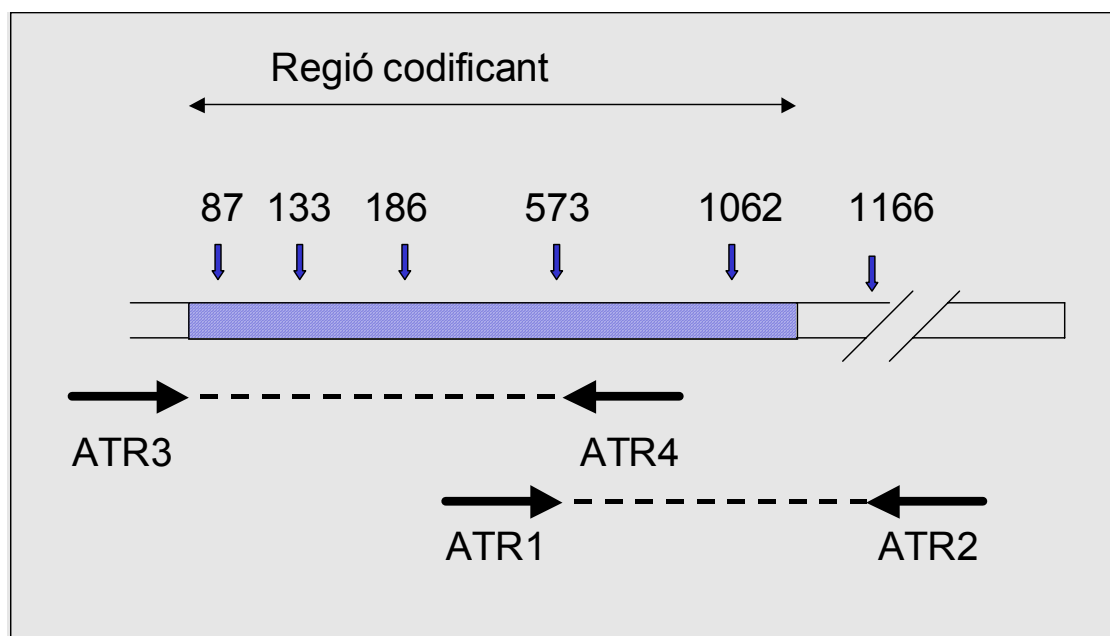


Figura 10. Localització del gen del AT1R a nivell del cromosoma 3 (255).

S'han descrit diverses variants polimòrfiques del gen del ATR1, uns ubicats a la regió codificant: el T573C i el A1062G, que són silencis; uns altres ubicats a la regió 3': el A1166C, el G1517T i el A1878G.

La variant polimòrfica A1166C, que consisteix en la substitució d'una citosina per una adenina a la posició 1166, és la que s'ha trobat associada a manifestacions fenotípiques. L'al·lel C d'aquest polimorfisme s'ha trobat associat a HTA (256), HTA greu (256), HTA precoç (257), nefropatia diabètica (258), HTA induïda per l'embaràs (259), rigidesa aòrtica (260), HVE (261) i major vasoconstricció arterial en resposta a l'angiotensina II (genotip CC) (262).

1.5.8 GEN DE L'ALDOSTERONA SINTASA (CYP11B2)

En el còrtex adrenal, l'aldosterona es sintetitza a partir de la deoxicorticoesterona mitjançant l'enzim aldosterona sintasa o CYP11B2. El gen que la codifica es localitza al cromosoma 8, a la banda 8q22. Es troba adjacent a un gen proper relacionat que codifica el CYP11B1 o l'esteroid 11- β -hidroxilasa, necessari per a la biosíntesi de cortisol (263,264). Les mutacions al CYP11B2 poden causar deficiència d'aldosterona (265). Per contra, una forma hereditària d'HTA, l'hiperaldosteronisme sensible a dexametasona, és causat per

recombinacions genètiques entre CYP11B1 i CYP11B2 que augmenten l'expressió del CYP11B2 i produeixen una secreció inapropiada d'aldosterona (266-268).

Recentment s'han descrit dos polimorfismes del gen de l'aldosterona sintasa:

- El primer es localitza a la regió de regulació de la transcripció o promotor del CYP11B2, 344 nucleòtids abans de la línia de la seqüència codificadora de la proteïna. El polimorfisme consisteix en el canvi d'una citosina per una timidina, generant-se 3 genotips: -344CC (individus homozigots per C), -344CT (heterozigots) i -344TT (homozigots per T).
- El segon polimorfisme es troba al segon intró del CYP11B2; en alguns individus, la seqüència habitual d'aquest intró està substituïda per la seqüència que es troba en el gen contigu CYP11B1. Aquesta substitució es denomina conversió, i els al·lels a aquest locus s'anomenen 1 (conversió) i 2 (no conversió) (269).

Els fenotips als que s'ha associat el polimorfisme -344CT són: HVE associada a l'al·lel C (270), major PA sistòlica (PAS) i major excreció urinària d'aldosterona associat al genotip TT (271), HTA amb renina baixa associat a l'al·lel C (272) i IAM associat al genotip CC en

pacients fumadors (RR 3.51), HDL baixa (RR 3.20) i PAS alta (RR 2) (273-274).

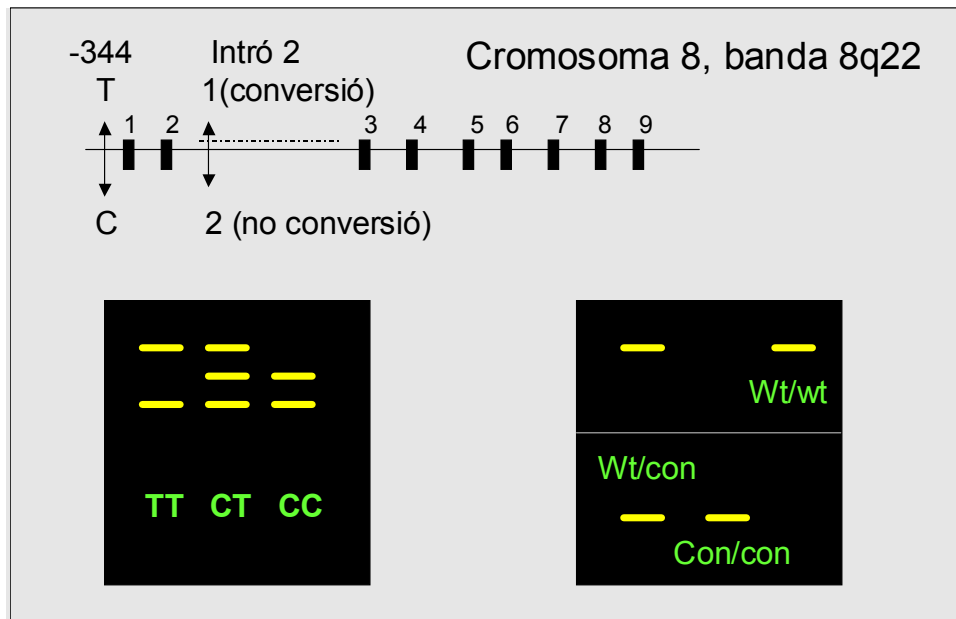


Figura 11. Localització dels polimorfismes -344CT i WT/CON del gen de l'aldosterona sintasa a nivell del cromosoma 8 (270).

1.5.9 GEN DEL TGF β 1

El gen que codifica el TGF β 1 es troba al cromosoma 19q13, conté set exons que codifiquen per una proteïna precursora de 390 aminoàcids (275), que posteriorment és processada proteolíticament per generar la proteïna madura de 112 aminoàcids. El promotor del TGF- β 1 conté dues zones principals per a la iniciació de la transcripció i múltiples zones reguladores, però no té els típics TATA o CAAT d'iniciació (276).

Recentment s'han descrit vuit polimorfismes: tres es localitzen a la regió 5' del gen del TGF- β 1 (a les posicions -988, -800 i -509), tres es troben a la regió codificant (als codons 10, 25 i 263), una inserció es localitza a nivell de la regió 5' a la posició +72 (277), i finalment una delecció d'una citosina a la seqüència que es troba vuit bases abans de l'exó 5 (713-8delC) (278).

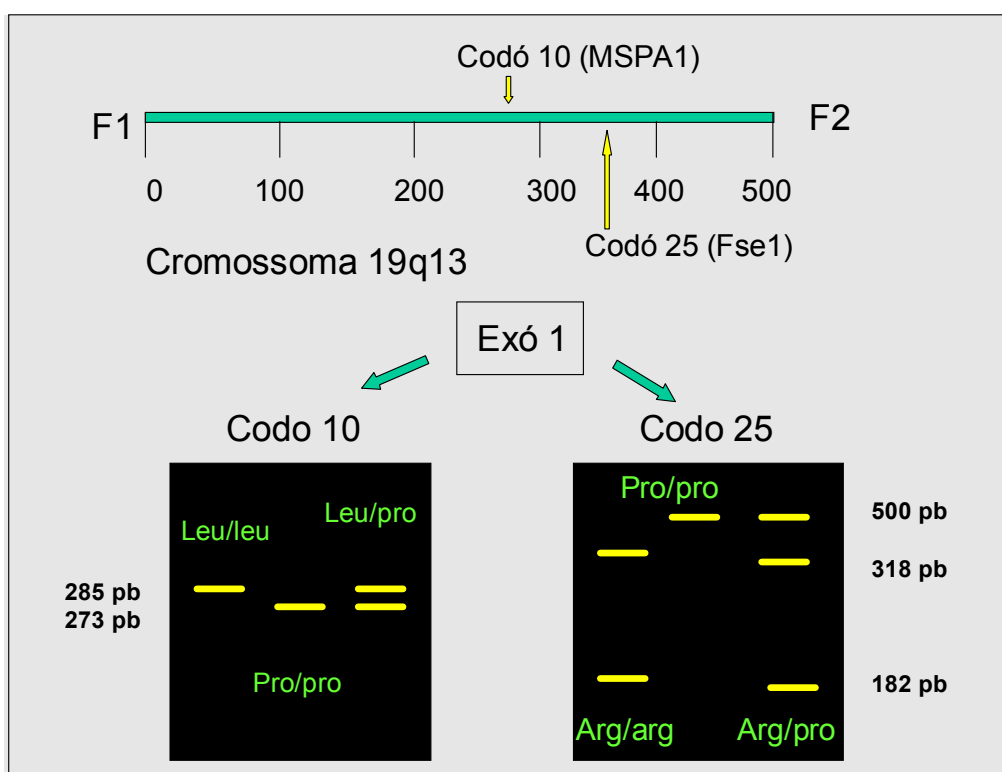


Figura 12. Polimorfismes del gen del TGF- β 1 a nivell dels codons 10 i 25 (279).

En les darreres publicacions s'ha demostrat l'associació d'alguns d'aquests polimorfismes amb el IAM (al·lel pro₂₅, al·lel leu₁₀), amb la nefropatia diabètica (al·lel leu₁₀), amb la nefropatia IgA (al·lel leu₁₀), amb

la regulació de la PA (al·lel arg₂₅) i amb els nivells sèrics de TGF-β1 (al·lel arg₂₅)(277,280-285).

1.5.10 ESTUDIS QUE EVALUEN L'EFECTE DE LA COMBINACIÓ DE DIFERENTS POLIMORFISMES GENÈTICS EN LA HIPERTENSIÓ ARTERIAL, AFECTACIÓ ORGÀNICA DE LA HIPERTENSIÓ I PROGRESSIÓ DE LA INSUFICIÈNCIA RENAL.

1. Williams SM et al. van avaluar l'efecte de combinacions en múltiples gens (ECA, angiotensinògen i AT1R) sobre la HTA. Van objectivar que de 120 "multilocus comparisons" possibles, setze s'associaven significativament a la presència d'HTA, concloent que més que les variacions en un únic gen, són les interaccions genètiques entre múltiples loci les responsables de les bases genètiques de la HTA essencial (286).
2. Pontremoli R et al. van estudiar la influència de diferents polimorfismes del SRAA (ECA, angiotensinògen i AT1R) en l'afectació orgànica de la HTA. Van objectivar que els pacients amb els genotips DD i ID de l'ECA presentaven uns nivells superiors de microalbuminúria i una major massa ventricular. Els altres genotips no van mostrar associació amb l'afectació orgànica de la HTA, quan s'estudiaven aïlladament. No obstant, van descriure una associació constituïda amb els genotips DD/ID de l'ECA, TT/TM de

l'angiotensinògen i AC/CC del AT1R, que s'associava a un major dany CV, a una major excreció urinària d'albúmina, major massa ventricular esquerra i major gruix de la paret carotídea (287).

3. Tomino Y et al. van avaluar la influència de diferents gens del SRAA (Angiotensinògen, ECA i AT1R) en pacients amb DM no insulíndependent. Van trobar una relació entre el genotip DD de l'ECA i la progressió de la nefropatia diabètica en tot el grup de pacients, i en el subgrup femení també s'hi associaven els genotips AC/CC de l'AT1R. Però a l'estudiar combinacions d'aquests genotips no varen trobar associació amb la progressió de la nefropatia diabètica (267).
4. Zoccali C, a l'estudi REIN, va avaluar l'efecte causat pels polimorfismes de l'ECA i de l' α -aducina en la progressió de la IR. Va objectivar en aquest estudi, que en pacients amb nefropaties proteïnúriques no diabètiques, la progressió de la IR era independent dels genotips de l'ECA i de l' α -aducina. No obstant, el genotip de l'ECA era predictor de l'efecte renoprotector dels IECA. Un subgrup dels pacients estudiats amb nefropatia IgA, mostraven una tendència a una progressió més ràpida en els homozigots pel DD (288).

5. Lovati E va estudiar la influència de diferents polimorfismes del SRAA (M235T de l'angiotensinògen, ID de l'ECA i -344TC de l'aldosterona sintasa) en la progressió de la IR. Va concloure que la susceptibilitat per la IRT i una progressió més ràpida cap a la IRT, estava associada al polimorfisme M235T de l'angiotensinògen en pacients amb DM. En la població global, la progressió més ràpida cap a la IRT s'associa al polimorfisme ID de la ECA, i al polimorfisme M235T de l'angiotensinògen quan s'avaluen solament pacients amb GN (289). En aquest estudi els únics factors clínics analitzats van ser la PA i la presència de DM.

6. Wang et al. van avaluar la influència de tres polimorfismes genètics (α -aducina Gly460Trp, ECA I/D i aldosterona sintasa -344C/T) sobre la funció renal. Van objectivar una associació entre els al·lels D de l'ECA i el Trp de l' α -aducina amb un empitjorament de la funció renal (290). En aquest estudi es va avaluar també el tractament amb hipotensors, DM i proteïnúria, i no s'afectaven els resultats.

En aquests estudis citats en que s'analitza la relació entre la progressió de la IR i diferents polimorfismes, no s'analitzen simultàniament altres variables clínic-bioquímiques que també podrien influir en la progressió de la IR.

He plantejat un estudi en que s'analitzin tant les variables clínic-analítiques com les variables genètiques.

La selecció dels polimorfismes genètics del SRAA es deu a la influència dels diferents components d'aquest sistema en la progressió de les nefropaties, ja sigui pel fet de participar en el control de la PA o pel fet d'intervenir en la proliferació/hipertròfia de les cèl·lules mesangials i a l'augment de la MEC.

D'altra banda, la tria dels polimorfismes del TGF- β 1, prové dels diferents estudis que impliquen aquest factor de creixement com un dels principals implicats en la fibrosi dels diferents teixits.

2 HIPOTESI DE TREBALL

1. Els malalts amb IR presenten una susceptibilitat individual en quant a la progressió cap a la IRT, que és:

- a. Independent en part dels tractaments proposats per frenar aquesta progressió (bon control de la PA, administració de fàrmacs inhibidors del SRAA).
- b. Independent de l'etiologia

2. Els efectes genètics sobre el desenvolupament o progressió de la IRC són additius i interaccionen amb factors clínics. Dels estudis clínics i experimentals sobre la fisiopatologia de la fibrogènesi renal es deriva que diferents gens poden estar associats al risc de presentar una progressió més ràpida de la IR i que podrien interaccionar epistàticament entre ells: com són els gens del SRAA (angiotensinògen, AT1R, ECA, aldosterona sintasa) i el gen del TGF- β 1.

3 OBJECTIUS

La finalitat d'aquest projecte és :

1. Analitzar si els polimorfismes del SRAA (M235T del gen de l'angiotensinògen, ID del gen de l'ECA, A1166C del gen del AT1R, CT i conversió/no del gen de l'aldosterona sintasa) i els polimorfismes del codo 10 i 25 del TGF- β 1 estan associats a IRC, comparant pacients amb IRC en HD versus un grup control.
2. Analitzar si els polimorfismes del SRAA (M235T del gen de l'angiotensinògen, ID del gen de l'ECA, A1166C del gen del AT1R, CT i conversió/no del gen de l'aldosterona sintasa) i els polimorfismes del codo 10 i 25 del TGF- β 1 estan associats a un ritme de progressió de la IRC més ràpid cap a la IRT.
3. Avaluar la interacció entre factors genètics i variables clíniques en la progressió de la IRC.

4 MATERIAL I MÈTODES

4.1 SUBJECTES

4.1.1 POBLACIÓ A ESTUDIAR

Criteris d'inclusió:

- La mostra analitzada eren pacients amb IRT en programa d'HD a la Divisió de Nefrologia de l'Hospital Clínic de Barcelona i a dos centres perifèrics d'HD dependents de l'Hospital. La informació clínica així com les dades analítiques avaluades provenien de l'acurada revisió de les històries clíniques dels pacients així com la revisió de les dades analítiques informatitzades. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic de l'Hospital Clínic.
- Solament es seleccionaren per l'estudi aquells pacients que haguessin estat seguits al nostre hospital per IRC almenys durant un any, i dels quals n'haguessim recollit com a mínim 4 determinacions de funció renal avaluades amb la creatinina, per poder calcular el pendent de progressió amb l'invers de la creatinina respecte al temps.

-
- L'edat a la qual arribaven a la IRT es considerà el moment en el que iniciaven l'HD.
 - Després d'aquesta selecció, els pacients que complien els criteris d'inclusió donaven el consentiment verbal i eren inclosos per a l'estudi.
 - Els factors de risc per a la progressió avaluats van ser: edat, sexe, tabaquisme, etiologia de la IR, PA, hiperuricèmia, dislipèmia, calcèmia, fosfatèmia, parathormona intacta (PTH_i), tractament amb IECA. Totes aquestes dades van ser recollides al moment de la primera visita a consulta externa al nostre hospital per IR.
 - Una altra dada recollida va ser la presència d'events CV durant el període de seguiment:
 - Cardiopatia isquèmica (diagnosticada per criteris clínics, analítics, electrocardiograma i/o cateterisme cardíac),
 - AVC (diagnosticat per criteris clínics i tècniques d'imatge, ja sigui tomografia cerebral o resonància)
 - Vasculopatia perifèrica (diagnosticada per criteris clínics i/o per arteriografia perifèrica).

Criteris d'exclusió:

- Pacients en HD com a conseqüència de IRA.

-
- Pacients en HD com a conseqüència d'una IRC, però diagnosticada en fase terminal o sense les dades suficients per haver-ne pogut seguir l'evolució.

4.1.2 **POBLACIÓ CONTROL**

Criteris d'inclusió

- La mostra analitzada provenia de donants del Banc de Sang i de pacients ingressats electivament per cirurgia als serveis d'oftalmologia i d'otorrinolaringologia.
- Edat compresa entre 25 i 85 anys.
- PAS inferior a 130 mm de Hg i PA diastòlica (PAD) inferior a 85 mm de Hg.

Criteris d'exclusió:

- Presència d'HTA, DM, nefropatia o IR.
- Presència de patologia CV (cardiopatia isquèmica, AVC o vasculopatia perifèrica).

4.2 MÈTODES

4.2.1 AVALUACIÓ DE LA PROGRESSIÓ DE LA IR

La progressió de la IR es calcula a partir del valor obtingut per anàlisi de regressió lineal simple dels valors de l'invers de la creatinina respecte al temps. La pendent obtinguda amb aquesta tècnica ens proporciona una estimació de la velocitat del canvi en la funció renal respecte al temps i ens serveix com a mesura del perfil de progressió de cada pacient individualment.

De cara a poder utilitzar el valor obtingut en diferents anàlisi comparant-ho a les altres variables, la distribució d'aquestes dades s'examinà gràficament i amb el test de Kolmogorov-Smirnov. Finalment s'aplicà una transformació logarítmica als valors absoluts de les pendents per corregir l'assimetria.

4.2.2 AÏLLAMENT DE L'ADN

L'ADN s'aïlla dels limfòcits de sang perifèrica pel mètode de precipitació salina.

Mètode de precipitació salina: S'extrauen 10 ml de sang i es col·loquen en un tub de 50 ml amb heparina sòdica, EDTA-K o citrat tri-sòdic. S'afegeix sèrum fisiològic fins a omplir el tub. Posteriorment es

centrifuga a 2700 rpm durant 10 minuts, descartant el sobrenadant amb la pipeta Pasteur. S'afegeix el buffer de lisi d'eritrocits fins a omplir el tub de 50 ml. (buffer de lisi d'eritrocits: Tris-HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM). Després es centrifuga a 3700 rpm durant 10 minuts i es descarta el sobrenadant. Es torna a afegir el buffer de lisi d'eritrocits fins a omplir el tub de 50 ml, es torna a centrifugar a 3700 rpm durant 10 minuts i es descarta el sobrenadant. S'afegeix 6 ml de buffer de lisi de leucocits, 400 µl de SDS (10%) i 1 ml de la solució de proteinasa K i es barreja amb una pipeta de 5 ml fins que tingui un aspecte homogeni. (Buffer de lisi de leucocits: NaCl 0.4 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 10 mM). (Solució de proteinasa K: proteinasa K 2mg/ml, SDS 1%, EDTA 2 mM). S'incuba a 37°C durant 4 hores o tota la nit en agitació. S'afegeix 1.3 ml de NaCl 5.5 M (saturat). S'agita 15 segons en el vortex i es centrifuga a 4100 rpm durant 20 minuts. Es recull el sobrenadant i es centrifuga durant 20 minuts a 3500 rpm, per acabar d'eliminar les sals precipitades que no s'havien eliminat en la primera centrifugació. Es recull de nou el sobrenadant i s'hi afegeix 7,5 ml de cloroform/IAA, s'agita 15 segons manualment i es centrifuga a 3500 rpm durant 5 minuts. (Cloroform/IAA: 24 ml de cloroform, 1 ml d'alcohol isoamilic). Es passa la fase superior a un tub de 50 ml i s'afegeix 15 ml d'etanol absolut. Es volteja el tub amb cura barrejant les dues fases. L'ADN precipita en forma de xarxa, cal pescar l'ADN amb una pipeta de 1 ml. A continuació cal fer dos rentats

amb 1 ml d'etanol al 70% per tal d'eliminar les sals. Finalment es seca l'ADN a 37°C i es redueix en 200 µl de TE.

Un cop aïllat l'ADN es determinen els diferents polimorfismes per amplificació d'un segment específic d'ADN mitjançant la tècnica de la PCR i posteriorment alguns d'ells es sotmeten a la digestió per diferents enzims de restricció.

4.2.3 QUANTIFICACIÓ DE L'ADN

Per saber exactament quina quantitat d'ADN havíem obtingut de cada pacient, es mesurava mitjançant l'espectofotòmetre.

Es determinava la densitat òptica a diferents longituds d'ona, sabent que a una longitud d'ona de 260 obtenim l'absorció d'àcids nucleics, que a 280 obtenim l'absorció dels àcids nucleics i de les proteïnes, i que a 310 no s'absorbeixen ni els àcids nucleics ni les proteïnes.

Es diluïa 5 µl de cada mostra d'ADN en 1 ml de TE. Es mesurava la densitat òptica (DO) a diferents longituds d'ona (260,280,310) i es calculava la quantitat d'ADN amb els següents càlculs:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l ADN} = \frac{(\text{DO}-260) \times 50}{1000} \times 200$$

$\text{puresa del ADN} = \frac{(\text{DO-260})}{(\text{DO-280})}$	ha de ser superior a 1.7
---	--------------------------

Un cop quantificat l'ADN realitzavem les dilucions pertinents de cada una de les mostres dels pacients per equilibrar totes les mostres a l'hora de fer la PCR i interpretar-ne els resultats.

4.2.4 TÈCNICA DE LA PCR

Per a l'amplificació del segment d'ADN on hi havia el polimorfisme a estudiar, realitzavem la tècnica de la PCR variant les característiques de temperatura del termociclador i de components (primers, quantitat de magnesi, etc) en funció del polimorfisme a estudiar.

Reactius necessaris per a la pràctica de les PCR:

- Aigua destilada
- Buffer d'amplificació x 10 (Boheringer Manheim, Alemanya)
- dNTP (Boheringer Manheim, Alemanya)
- MgCl₂ (pot posar-s'hi o no segons la PCR) (Boheringer Manheim, Alemanya)
- "Primers", varien en funció de la zona que volem amplificar
- ADN diluït en aigua destilada
- Taq polimerasa (Boheringer Manheim, Alemanya)

Es prepara una solució denominada solució mescla (amb tots els components excepte l'ADN problema), les quantitats de cada un dels components varien en funció de les característiques de cada PCR.

Es reparteix la solució per un nombre de tubs determinat en funció del nombre de mostres d'ADN que volguem analitzar. I posteriorment s'afegeix a cada tub el seu ADN problema.

Per cada PCR s'usa un control negatiu (solució mescla sense ADN), per detectar que no hi hagi hagut una contaminació, de forma que se'ns invalidaria la PCR. S'afegeix a cada tub oli mineral per evitar que s'evapori la mostra durant la PCR. Es col·loquen els tubs dins el termociclador. Es desnatura durant 5 minuts a 96°C i es segueix d'un programa específic segons el fragment d'ADN a amplificar:

- 1- Fase de desnaturalització o separació de l'ADN
- 2- Fase d'hibridació o anellament
- 3- Fase d'extensió, còpia o síntesi de l'ADN
- 4- Repetició de les diferents fases un nombre determinat de vegades.

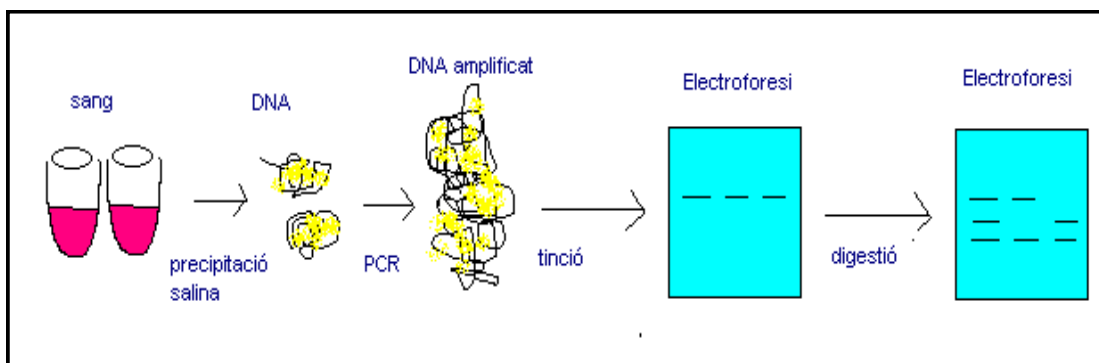


Figura 13. Representació gràfica dels diferents passos des de l'obtenció de la mostra de sang, ampliació de l'ADN, electroforesi i visualització de les bandes corresponents als diferents polimorfismes.

4.2.5 POLIMORFISME M235T DE L'ANGIOTENSINOGEN

El polimorfisme M235T de l'angiotensinògen s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers" :

Sense : 5'TG GAT GCG CAC AAG GTC CTG TC 3'

Antisense : 5'CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGC TCG 3'

I les següents condicions de PCR:

- 1^a Fase de desnaturalització 94°C durant 30 segons
- 2^a Fase d'hibridació 61°C durant 30 segons
- 3^a Fase d'extensió 72°C durant 30 segons
- Repetició de les 3 primeres fases 35 vegades
- 4^a Fase d'extensió final 72°C durant 5 minuts
- 5^a Fase 4°C indefinidament

Posteriorment els productes obtinguts per la PCR són digerits mitjançant l'enzim de restricció SfiI (New England Biolabs, Beverly, Mass., USA) essent incubats a una temperatura de 37°C durant 4 hores, tenyits amb bromur d'etidi i sotmesos a electroforesi en un gel de poliacrilamida al 10% i es visualitzen per transil·luminació. El fragment amplificat del gen de l'angiotensinogen té 303 pb. Si el genotip és la variant MM la digestió amb l'enzim produeix 2 fragments de 266 i 37 pb. En canvi si la variant és la TT, l'enzim no reconeix la seqüència i no es produeix la digestió, essent el resultat final un fragment de 303 pb. Els genotips resultants són MM, MT i TT.

Enzim de restricció SfiI (Biolabs, New England, Beverly, MA USA)

- Enzim de restricció procedent d'*Streptococcus faecalis* (ATCC ND547) resuspès en KCl 50mM, Tris-HCl 10mM (pH7.4), EDTA 0.1mM, DTT 1 mM, BSA 200 µg/ml i 50% de glicerol.
- Seqüència de reconeixement GCATC (5/9)
- Buffer x 10: Na Cl 100mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, Dtt 1mM pH 7.9 a 25°C.

Gel de poliacrilamida al 7%: 17.5mL d'acrilamida-bis, 62.5mL d'aigua destilada, 5mL de TBEx20, 15mL de glicerol, 143µL de APS al 10% (pentasulfat amònic) i 58µL de TEMED (catalitzador). Es barregen tots els components i es col·loca la mescla a la placa dels gels i es deixa

polimeritzar a la nevera.

4.2.6 POLIMORFISME INSERCIÓ/DELECCIÓ DE L'ECA

El polimorfisme I/D de l'ECA s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers" o cebadors

sense: 5'CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'

antisense 5'GAT GTG GCC ATC ACA TTG GTC AGA T 3'

I les següents condicions de PCR:

- 1^a Fase de desnaturalització 94°C durant 30 segons
- 2^a Fase d'hibridació 58°C durant 30 segons
- 3^a Fase d'extensió 72°C durant 1 minut
- Repetició de les 3 primeres fases 35 vegades
- 4^a Fase d'extensió final 72°C durant 5 minuts
- 5^a Fase 4°C indefinidament

Posteriorment, i un cop tenyides amb bromur d'etidi, es separen per electroforesi les diferents bandes en un gel d'agarosa al 2% i es visualitzen per transil·luminació. Així s'obtenen 2 bandes de 490 parells de bases (pb) i de 190 pb que corresponen als al·lels I i D, respectivament. Alguns pacients considerats DD erròniament degut a l'amplificació preferencial de l'al·lel petit D són reamplificats amb un "primer" específic per l'al·lel inserció obtenint-se un producte de 335 pb que correspon a l'al·lel I. Els genotips resultants són DD, DI i II.

Gel d'agarosa al 2%: 2 g d'agarosa en 100 ml d'aigua destilada i 2 ml de sals (TAE_x50). S'escalfa fins a l'ebullició i s'hi afegeix 5 µl de bromur d'etidi, es col·loca l'agarosa en unes plaques i es deixa sol·lidificar uns 20 minuts.

4.2.7 POLIMORFISME A1166C DEL GEN DEL AT1R

El polimorfisme A1166C del gen del AT1R s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers":

Sense 5'ATA ATG TAA GCT CATC CACC 3'

Antisense 3'GAG ATT GCA TTT CTGT CAGT 5'

I les següents condicions de PCR:

- 1^a Fase de desnaturalització 96°C durant 30 segons
- 2^a Fase d'hibridació 58°C durant 45 segons
- 3^a Fase d'extensió 72°C durant 45 segons
- Repetició de les 3 primeres fases 39 vegades
- 4^a Fase d'extensió final 72°C durant 5 minuts
- 5^a Fase 20°C indefinidament

Els productes obtinguts per la PCR són digerits posteriorment per l'enzim de restricció Dde1 (Toyobo, Osaka, Japó), tenyits amb bromur d'etidi i sotmesos a electroforesi en un gel d'agarosa al 2%, i visualitzats per transil·luminació.

Els 2 fragments resultants tenen el tamany de 546 pb corresponent a l'al·lel A i de 435 pb corresponent a l'al·lel C. Els genotips resultants són AA, AC i CC.

Enzim de restricció Dde I:

- Enzim de restricció procedent de *Desulfovibrio desulfuricans* (NCIB 83120) suspès en KCl 50mM, Tris-HCl 10mM (pH7.4), EDTA 0.1mM, DTT 1 mM, BSA 200 µg/ml i 50% de glicerol
- Seqüència de reconeixement 5' C- TNAG 3'
3' GANT-C 5'
- Buffer x 1: NaCl 100mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM pH 7.9 a 25°C.

4.2.8 POLIMORFISMES -344C/T I WT/CONVERSIÓ DEL GEN DE L'ALDOSTERONA SINTASA

El polimorfisme -344C/T del gen del CYP11B2 s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers":

Sense 5'CAG GAG GAG ACC CCA TGT GAC 3'

Antisense 3'CCT CCA CCC TGT TCA GCC C 5'

I les següents condicions de PCR:

- 1^a Fase de desnaturalització 94°C durant 1 minut
- 2^a Fase d'hibridació 67°C durant 1 minut

- 3^a Fase d'extensió 72°C durant 1 minut
- Repetició de les 3 primeres fases 34 vegades
- 4^a Fase d'extensió final 72°C durant 4 minuts
- 5^a Fase 20°C indefinidament

El producte amplificat per la PCR descrita és sotmès a una digestió per l'enzim Hae III obtenint-se, mitjançant tinció amb bromur d'etidi, electroforesi en un gel d'agarosa al 2% i visualitzat per transil·luminació, tres fragments de 274 pb, 203 pb i de 71 pb, que corresponen a l'al·lel T el 1er (quan no hi ha digestió) i a l'al·lel C el 2on i 3er (quan el fragment de 274 pb ha estat digerit en 2 fragments). Així s'obtenen 3 genotips que són el CC, CT i el TT.

Enzim de restricció Hae III (Biolabs, New England, Beverly, MA USA)

- Enzim de restricció procedent de *Haemophilus Aegypticus* suspès en KCl 100mM, Tris-HCl 10mM (pH7.4), EDTA 0.1mM, 2-mercapto-etanol 10 mM, BSA 500 µg/ml i 50% de glicerol
- Seqüència de reconeixement 5'GGCCGG-CC3'
3'CC-GGCCGG5'
- Buffer x 1: NaCl 50mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM pH 7.9 a 25°C.

El polimorfisme de l'intró 2 del gen del CYP11B2 s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers"

Sense 1 5' CAGAAAATCCCTCCCCCCTA3'

Sense 2 5' TGGAGAAAAGCCCTACCCTGT3'

Antisense 3' AGGAACCTCTGCACGGCC5'

I les següents condicions de PCR:

- 1^a Fase de desnaturalització 94°C durant 1 minut
- 2^a Fase d'hibridació 62°C durant 1 minut
- 3^a Fase d'extensió 72°C durant 2 minuts
- Repetició de les 3 primeres fases 34 vegades
- 4^a Fase d'extensió final 72°C durant 5 minuts
- 5^a Fase 20°C indefinidament

Un cop amplificat per la PCR descrita, el producte es tenyeix i és sotmès a una electroforesi en un gel d'agarosa al 2%, visualitzant-se per transil·luminació.

Les dues reaccions utilitzen el mateix "primer" antisense. Les reaccions per detectar l'al·lel 1 amb el gen conversió (producte de 1013 pb) usen el "primer" sense 1, mentre que les reaccions per detectar l'al·lel 2 que no contenen el gen conversió, usen el "primer" sense 2.

4.2.9 POLIMORFISMES LEU10PRO I ARG25PRO DEL GEN DEL TGF- β 1

El polimorfisme Leu10Pro del gen del TGF- β 1 s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers"

Sense 5'TTC AAG ACC ACC CAC CTT CT3'

Antisense 3'TCG CGG GTG CTG TTG TAC A 5'

I les següents condicions de PCR:

- 1^a Fase de desnaturalització 94°C durant 45 segons
- 2^a Fase d'hibridació 60°C durant 45 segons
- 3^a Fase d'extensió 72°C durant 45 segons
- Repetició de les 3 primeres fases 35 vegades
- 4^a Fase d'extensió final 72°C durant 5 minuts
- 5^a Fase 4°C indefinidament

Posteriorment el producte amplificat és digerit per l'enzim MspA1, tenyit amb bromur d'etidi, sotmes a electroforesi en un gel de poliacrilamida al 7% i visualitzat per transil·luminació. Així s'obtenen 2 bandes de 285 i 273 pb que corresponen a l'al·lel leu i l'al·lel pro respectivament donant lloc als 3 genotips leuleu, leupro i propro.

Enzim de restricció MSPA 1 (Biolabs, New England, Beverly, MA USA)

- Enzim de restricció procedent de *Moraxella* species suspès en NaCl 250mM, Tris-HCl 20mM (pH7.4), EDTA 0.1mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 10mM, BSA 200 µg/ml i 50% de glicerol.

- Seqüència de reconeixement
$$\begin{array}{c} \text{A} \quad \text{G} \\ 5' \text{CCG- CTG} 3' \\ \text{T} \quad \text{C} \\ 3' \text{CGC-GAC} 5' \end{array}$$

- Buffer x 1: acetat de potassi 50mM, acetat deTris-HCl 20 mM, acetat de Mg 10 mM, DTT 1mM pH 7.9 a 25°C.

El polimorfisme Arg25Pro del gen del TGF-β1 s'amplifica per la tècnica de la PCR usant els següents "primers"

Sense 5'TTC AAG ACC ACC CAC CTT CT3'

Antisense 3'TCG CGG GTG CTG TTG TAC A 5'

I les següents condicions de PCR:

- 1ª Fase de desnaturalització 94°C durant 45 segons
- 2ª Fase d'hibridació 60°C durant 45 segons
- 3ª Fase d'extensió 72°C durant 45 segons
- Repetició de les 3 primeres fases 35 vegades
- 4ª Fase d'extensió final 72°C durant 5 minuts
- 5ª Fase 4°C indefinidament

Un cop amplificat, el producte obtingut és digerit per l'enzim FseI, tenyit amb bromur d'etidi, sotmès a electroforesi en un gel de poliacrilamida al 7% i visualitzat per transil·luminació, observant-se tres bandes de 500pb (no digestió), 318 pb (digestió parcial) i de 182 pb (digestió total) que corresponen als 3 genotips argarg, argpro i propro.

Enzim de restricció FseI (Biolabs, New England, Beverly, MA USA)

- Enzim de restricció procedent de Frankia species Eul 1b (NRRL 18528) suspès en NaCl 200mM, Tris-HCl 10mM (pH7.4), EDTA

0.1mM, DTT 1 mM, BSA 200 µg/ml i 50% de glicerol

- Seqüència de reconeixement 5'GGCCGG-CC3'
3'CC-GGCCGG5'
- Buffer x 1: acetat de potassi 50mM, acetat deTris-HCl 20 mM, acetat de Mg 10 mM, DTT 1mM pH 7.9 a 25°C.

4.2.10 ANÀLISI ESTADÍSTIC

Els resultats es presenten com la mitja \pm desviació estandard per a les variables de distribució contínua; com a mediana (rang) per les variables de distribució no normal, i com a freqüències per a les variables categòriques.

Les diferències entre els diferents genotips s'han analitzat usant el test d'Anova, seguit de la correcció per comparacions múltiples de Bonferroni o pel test de χ^2 , segons procedís.

La freqüència de distribució dels genotips es comparà entre pacients i malalts pel test de χ^2 . A més, el desequilibri de Hardy-Heinberg es testà per cada lloc polimòrfic usant el test estadístic del χ^2 .

Les diferències en el log de les pendents entre els genotips es van analitzar usant el test one-way ANOVA.

Per veure la influència de les diferents variables en la progressió de la IR, es practicà un anàlisi univariant abans d'incloure-les en el model

multivariant. Per les dades dicotòmiques (sexe, tabaquisme, dislipèmia, hiperuricèmia, DM i tractament amb IECA), es practicà un test de t de Student per comparar el log de les pendents entre els diferents grups. Les diferències entre les etiologies de la IR, es van analitzar usant el test del one-way ANOVA. En quant a les dades de distribució contínua (edat, calci, fosfat, PTH_i sèrica, hematocrit, potassi sèric, PAS, PAD), els candidats per entrar al model es seleccionaren calculant els coeficients de Pearson i Spearman.

El model multivariant es confeccionà seguint la següent estratègia de selecció. Per començar, les variables contínues que correlacionaven significativament amb el log de la pendent es seleccionaren com a candidats per entrar al model. Per la seva correlació amb la progressió de la IR en aquest anàlisi, els polimorfismes A1166C i el M235T, es proposaren pel procediment de “stepwise regresión” per ser inclosos en el model de regressió. Per evitar l'efecte de la codificació ordenada, aquestes variables s'inclogueren com a factors fixes en el model lineal general i testats per ANOVA. Es van considerar dues opcions: mantenir tres genotips per locus polimòrfic i col·lapsar les tres opcions en dues.

Finalment les dades clíniques amb significancia marginal en l'anàlisi univariant van ser també incloses en el procediment “stepwise”.

Per a la identificació dels factors associats de forma independent amb les complicacions CV en els pacients amb IRC, es realitzà un anàlisi de

regressió logística. Les variables s'inclogueren quan obteníem una $p < 0.05$ en l'anàlisi univariant amb la patologia CV com a variable dependent, i les variables clíniques i bioquímiques com a variables independents.

L'anàlisi de la supervivència mitjançant el test de Kaplan-Meier, considerant com a fi de la supervivència renal el temps de l'inici del tractament substitutiu amb HD.

Els punts finals de l'estudi van ser el temps fins a l'inici de l'HD i la pèrdua de la funció renal (pendent de l'invers de la creatinina).

Es considerà significativa una $p < 0.05$.

Els anàlisi es realitzaren usant el programa estadístic del SPSS versió 11 (SPSS Inc.)

5 RESULTATS

5.1 ANÀLISI DE LA DISTRIBUCIÓ DELS GENOTIPS EN PACIENTS AMB IRT I EN CONTROLS.

Les freqüències dels diferents genotips no es desviaven de l'equilibri de Hardy-Weinberg en pacients i controls excepte pels polimorfismes wt/conv del CYP11B2 i pel polimorfisme del codó10 del gen del TGF- β 1. En les següents taules es mostra la comparació entre pacients i població sana de la distribució dels diferents genotips:

Taula 1. Distribució dels genotips del polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinògen ($p=0.855$)

Pacients	N= 104		Controls	N=133	
MM	MT	TT	MM	MT	TT
28	37	39	29	62	42
(27%)	(36%)	(37%)	(22%)	(47%)	(32%)

Taula 2. Distribució dels genotips del polimorfisme ID del gen de l'ECA ($p=0.292$)

Pacients	N=104		Controls	N=133	
II	ID	DD	II	ID	DD
17	45	42	20	62	51
(16%)	(43%)	(41%)	(15%)	(47%)	(38%)

Taula 3. Distribució dels genotips del polimorfisme A1166C del AT1R ($p=0.165$)

Pacients	N=104		Controls	N=133	
CC	AC	AA	CC	AC	AA
5	44	55	12	66	55
(5%)	(42%)	(53%)	(9%)	(50%)	(41%)

Taula 4. Distribució dels genotips del polimorfisme -344CT del CYP11B2 (p=0.052)

Pacients N=104			Controls N=133		
CC	CT	TT	CC	CT	TT
16	58	30	32	53	48
(16.4%)	(55.8%)	(28.9%)	(24%)	(40%)	(36%)

Taula 5. Distribució dels genotips del polimorfisme WT/conv del CYP11B2 (p=0.005)

Pacients N= 104			Controls N=133		
WT/WT	WT/conv	Conv/conv	WT/WT	WT/conv	Conv/conv
24	62	18	49	51	33
(23%)	(60%)	(17%)	(37%)	(38%)	(25%)

Taula 6. Distribució dels genotips del polimorfisme leu10pro del TGF- β 1 ($p=0.001$)

Pacients N=104			Controls N=133		
Leuleu	Leupro	Propro	Leuleu	Leupro	Propro
36	52	16	40	31	62
(35%)	(50%)	(15%)	(30%)	(23%)	(47%)

Taula 7. Distribució dels genotips del polimorfisme arg25pro del TGF- β 1 ($p=0.019$)

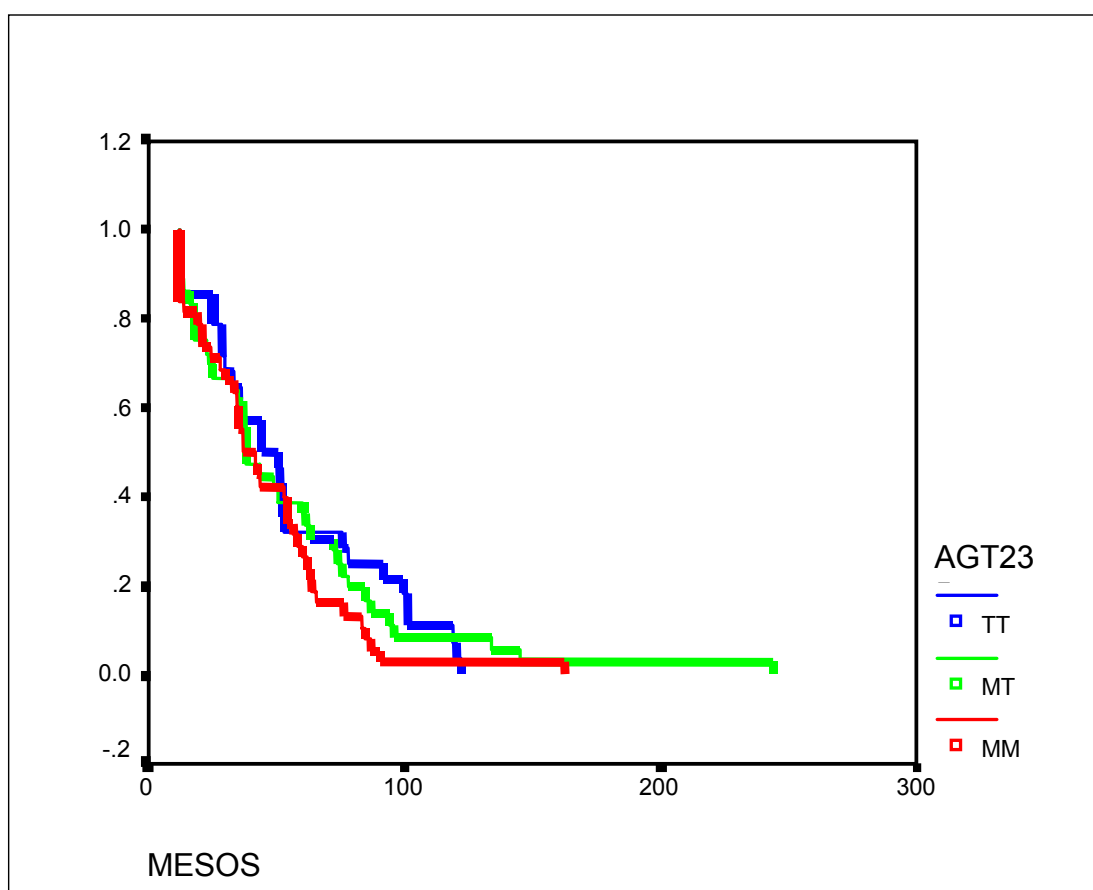
Pacients N=104			Controls N=133		
Argarg	Argpro	Propro	Argarg	Argpro	Propro
82	22	0	116	13	4
(79%)	(21%)	(0%)	(87%)	(10%)	(3%)

5.2 2.ANÀLISI DE PROGRESSIÓ CAP A LA IR TERMINAL SEGONS ELS DIFERENTS GENOTIPS

5.2.1 2.A. ANÀLISI DE LA SUPERVIVÈNCIA EN FUNCIO DE CADA GENOTIP

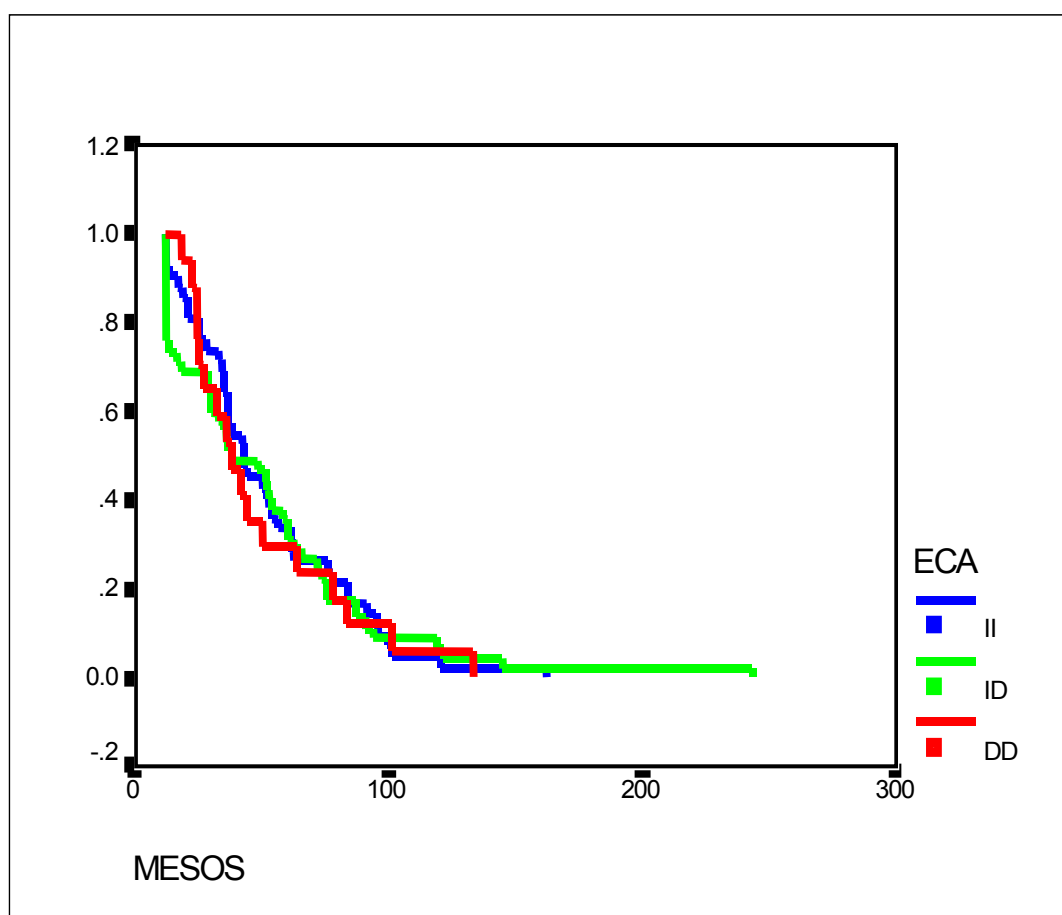
Per analitzar la influència de cada un dels polimorfismes en la progressió de la IRC, hem calculat el temps de supervivència usant el test estadístic del Kaplan Meier.

Respecte al polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinògen, no varem trobar diferències estadísticament significatives en quant a la supervivència entre els diferents genotips (MM 55.1mesos, MT 54.5 mesos, TT 45.6 mesos, $p=0.44$).



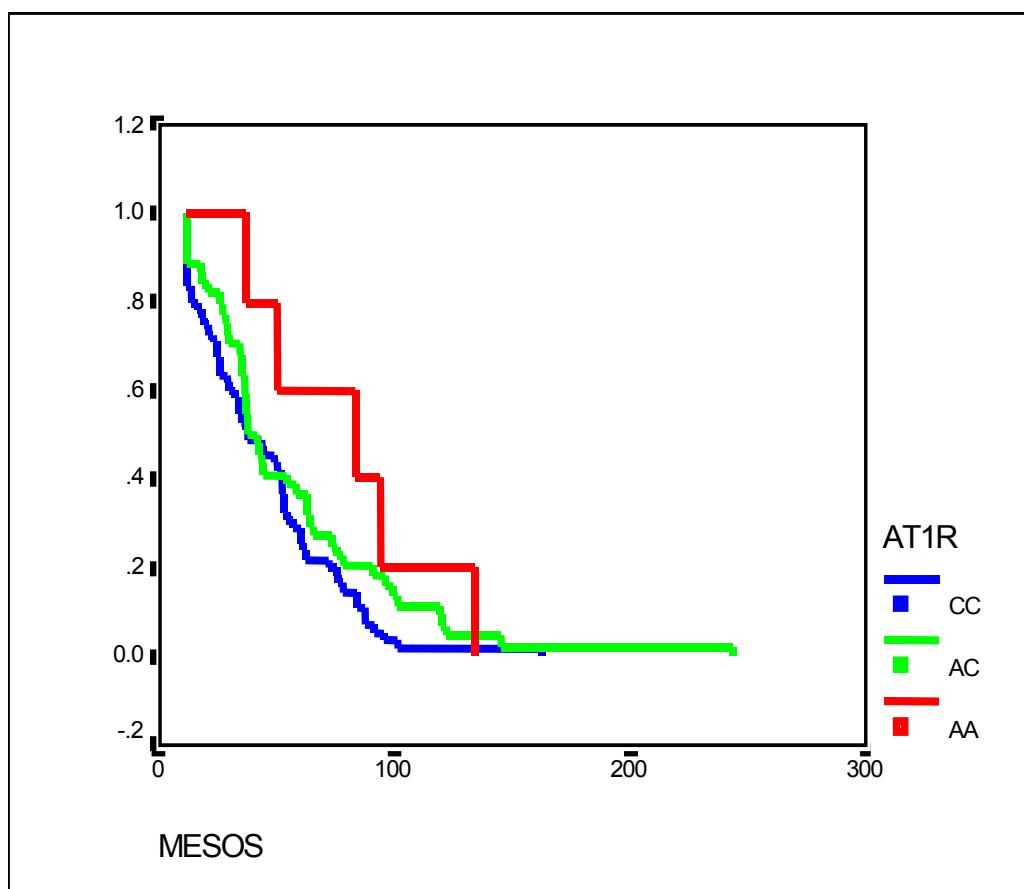
Gràfic 1. Corbes de supervivència dels genotips TT (en blau), MT (en verd) i MM (en vermell) del gen de l'angiotensinògen.

La supervivència mitjana dels diferents genotips del polimorfisme ID del gen de l'ECA va ser la següent: II 49.4 mesos, ID 51.6 mesos i DD 52.4 mesos ($p=0.95$).



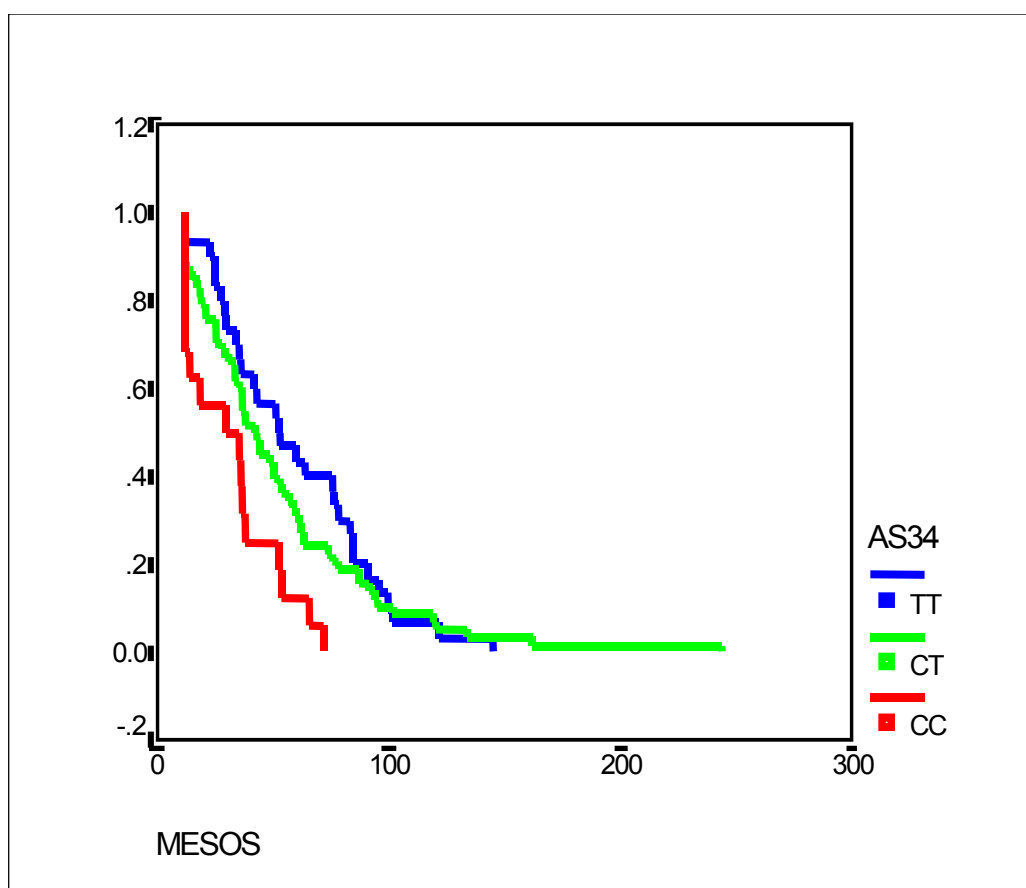
Gràfic 2. Corbes de supervivència dels genotips II (en blau), ID (en verd) i DD (en vermell) del gen de l'ECA.

La supervivència mitja dels diferents genotips del polimorfisme A1166C del gen del AT1R va ser la següent: CC 79.4 mesos, AC 56.4 mesos i AA 45.2 mesos ($p=0.13$).

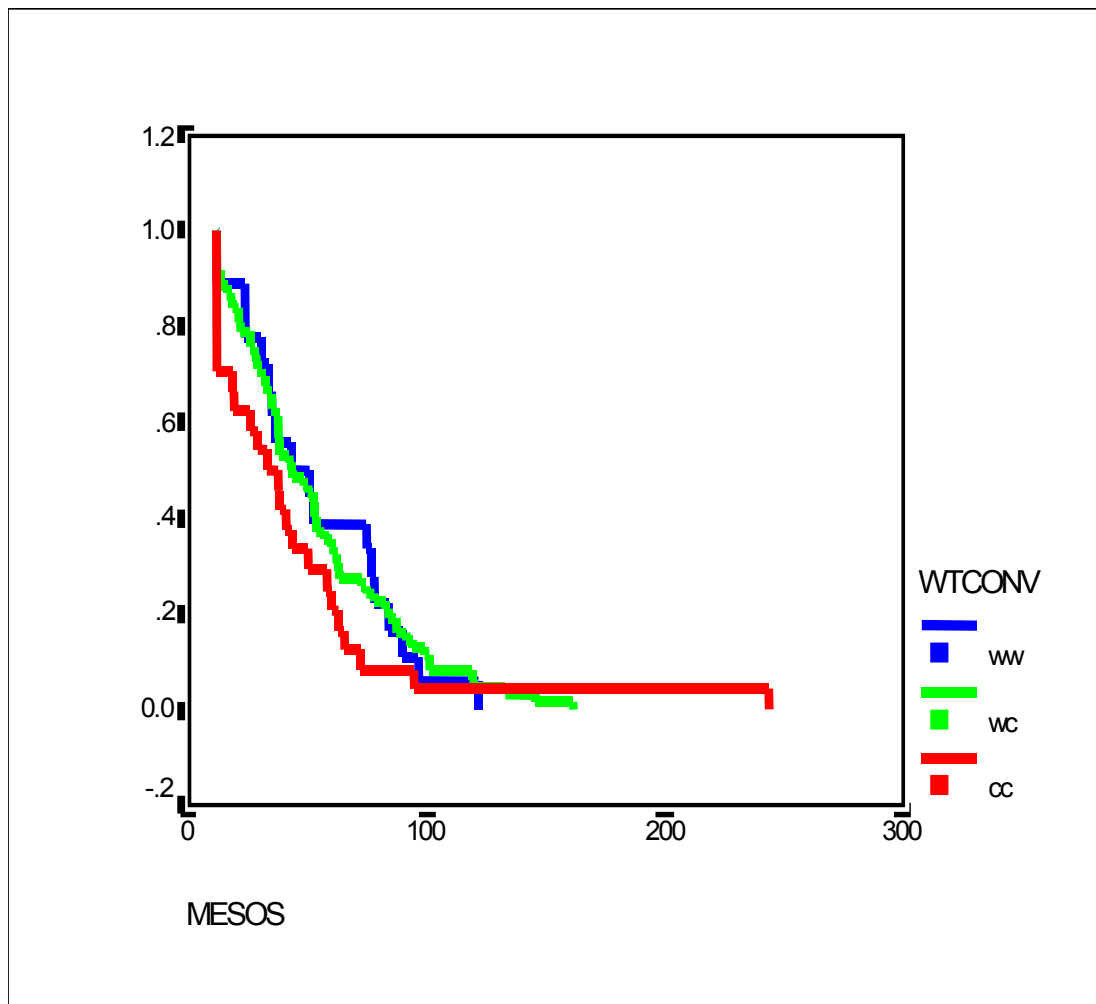


Gràfic 3. Corbes de supervivència dels genotips CC (en blau), AC (en verd) i AA (en vermell) del gen del AT1R.

En quant als polimorfismes del gen de l'aldosterona sintasa, en la supervivència dels genotips de l'intró 2 no varem trobar diferències estadísticament significatives (WTWT 44.8 mesos, Wtconv 53.5 mesos i convconv 54.1 mesos, $p=0.48$) mentre que si varem trobar diferències estadísticament significatives entre els genotips del polimorfisme -344CT (CC 31.9 mesos, CT 52.9 mesos, TT 59.4 mesos, $p<0.05$).

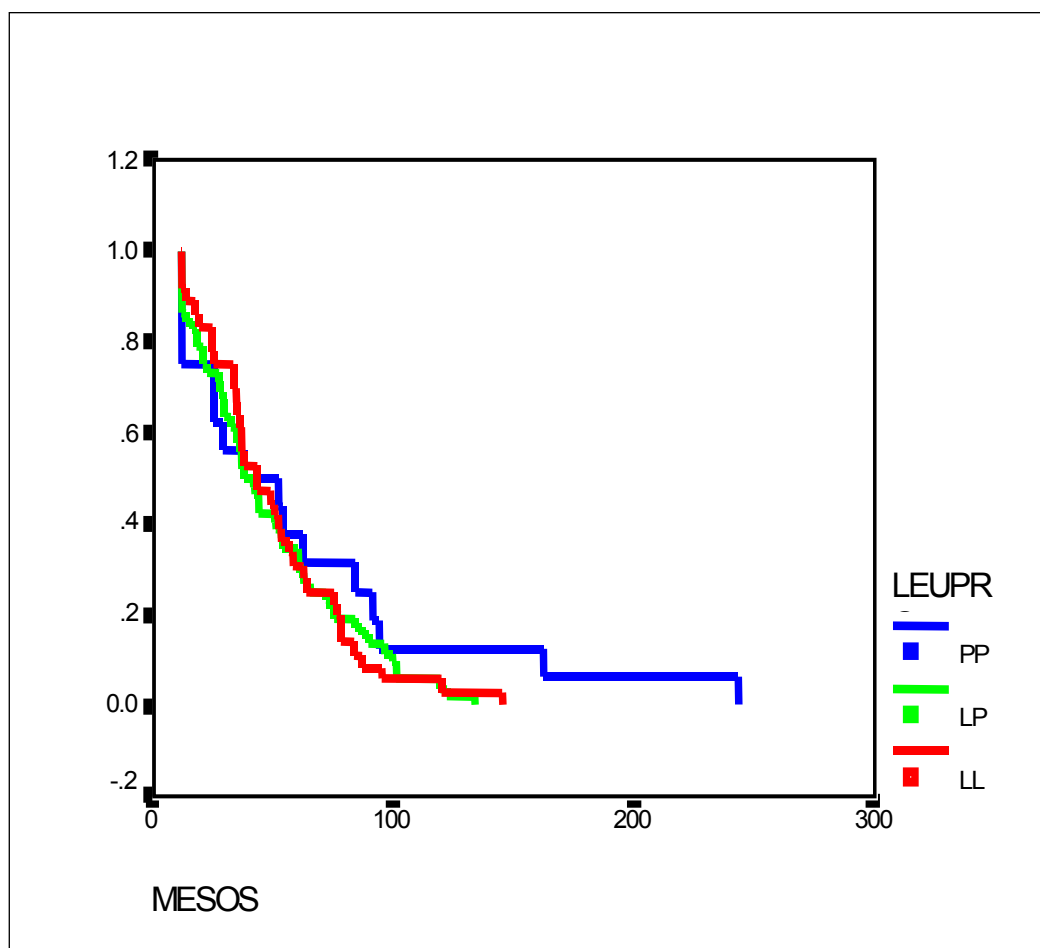


Gràfic 4. Corbes de supervivència dels genotips TT (en blau), CT (en verd) i CC (en vermell) del gen del CYP11B2



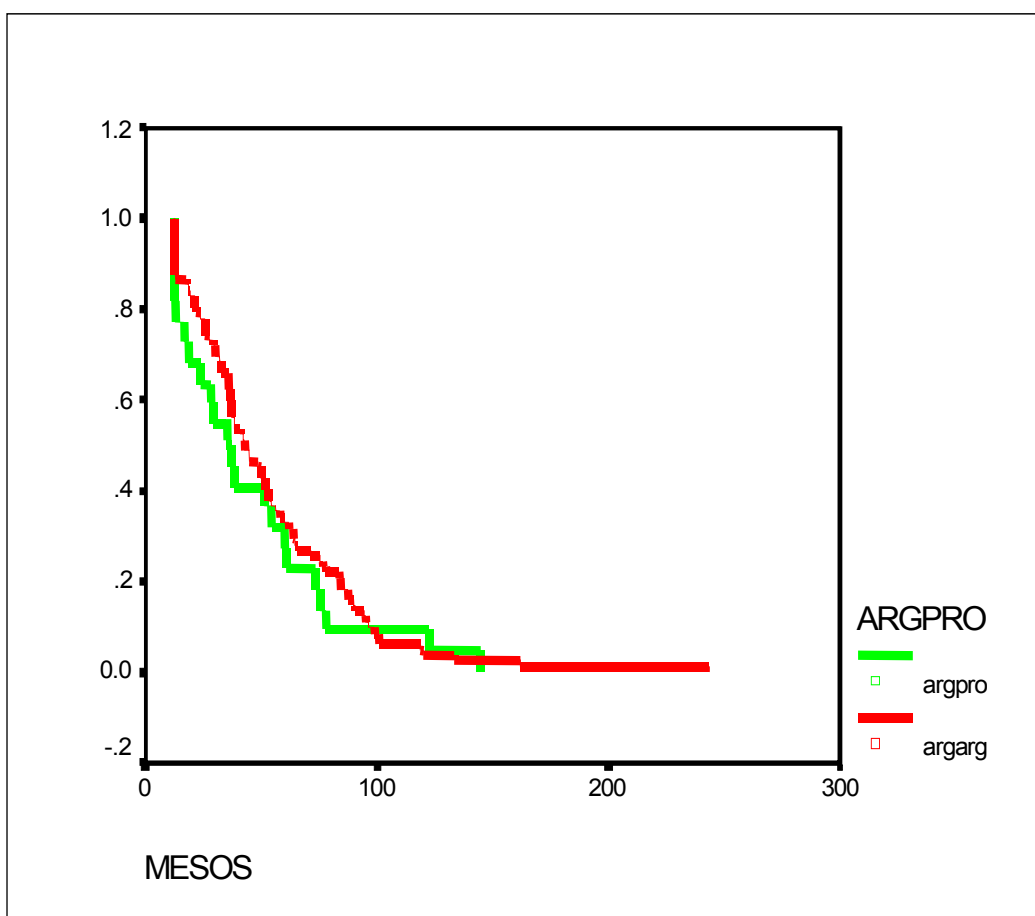
Gràfic 5. Corbes de supervivència dels genotips wtwt (en blau), wtconv (en verd) i convconv (en vermell) del gen del CYP11B2

En quant al polimorfisme del codo 10, la supervivència mitja calculada va ser de 50.2 mesos pel genotip leuleu, de 48.9 mesos pel genotip leupro i de 63 mesos pel genotip leupro ($p=0.48$).



Gràfic 6. Corbes de supervivència dels genotips leuleu (en vermell), leupro (en verd) i propro (en blau) del gen del TGF- β 1.

La supervivència mitja calculada va ser de 53.2 mesos pel genotip argarg i de 45.6 mesos pel genotip argpro ($p=0.45$).

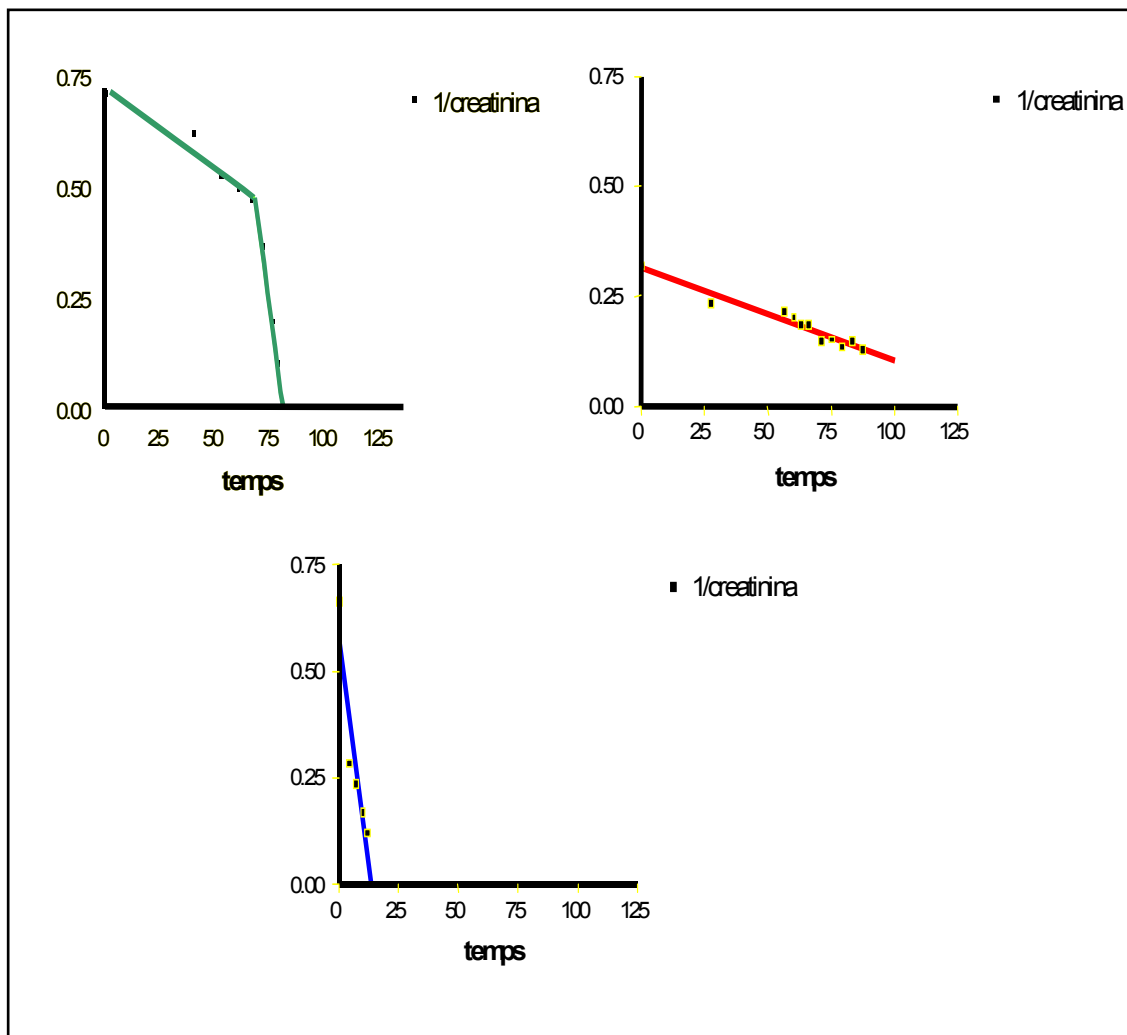


Gràfic 7. Corbes de supervivència dels genotips argarg (en vermell) i argpro (en verd) del gen del TGF- β

5.2.2 ANÀLISI DE LA RELACIÓ ENTRE LA PENDENT DE LA IR I ELS GENOTIPS

5.2.2.1 Estudi de la progressió

Quan varem revisar les progressions dels diferents pacients varem veure que no tots s'ajustaven a una pendent recta, sino que alguns s'ajustaven més a dues pendents i d'altres més a una paràbola. Així doncs el càlcul amb la recta és imprecís en un tant per cent dels cassos (gràfic 8), però actualment és el mètode acceptat com a menys dolent, essent utilitzat per tots els estudis de progressió i polimorfismes. Per aquest motiu, el pendent de 1/creatinina respecte al temps, és el valor el que hem tingut en consideració.



Gràfic 8. Exemple de diferents rectes obtingudes amb el càlcul del "invers de la creatinina respecte al temps.

5.2.2.2 Relació entre la velocitat de progressió i els diferents polimorfismes

Hem analitzat la influència en la velocitat de progressió (logaritme 1/creatinina) de la IR produïda pels diferents polimorfismes.

De tots els gens analitzats, solament hem trobat una relació estadísticament significativa entre el polimorfisme del gen del AT1R i la progressió, de forma que els pacients amb el genotip AA progressaven més ràpids cap a la IRT que els pacients amb el genotip CC; així mateix hem trobat una relació estadísticament significativa entre el polimorfisme M235T de l'angiotensinògen i la velocitat de progressió que és difícil d'explicar donat que anaven més ràpids els heterozigots que els homozigots.

Taula 8. Relació velocitat de progressió-genotips.

Polimorfisme	Pendent	p
Receptor AT1: CC	-5.53 ± 0.22	
AC	-5.09 ± 0.66	0.04
AA	-4.87 ± 0.66	
Aldosterona sintasa		
-344CT: CC	-4.72 ± 0.52	
CT	-5.05 ± 0.75	0.201
TT	-5.04 ± 0.51	
WT/CONV: wwt	-4.82 ± 0.81	
wtconv	-5.08 ± 0.64	0.245
convconv	-4.94 ± 0.48	
ECA : II	-5.22 ± 0.44	
ID	-4.92 ± 0.75	0.296
DD	-4.99 ± 0.62	
Angiotensinògen: TT	-4.82 ± 0.62	
MT	-5.24 ± 0.59	0.02
MM	-4.91 ± 0.74	
TGF-β1Cod10 leuleu	-4.97 ± 0.57	
leupro	-4.94 ± 0.72	0.43
propro	-5.19 ± 0.61	
Cod 25: argarg	-5.003 ± 0.57	
argpro	-4.97 ± 0.92	0.85

5.3 AVALUACIÓ DE LES DADES CLÍNIC-ANALÍTiques I LA SEVA INFLUÈNCIA SOBRE LA PROGRESSIÓ DE LA IR

5.3.1 CARACTERÍSTiques CLÍNiques DE LA POBLACIÓ A ESTUDI

Hem estudiat 104 pacients, 62 homes (%) i 42 dones (%), amb edat mitja de 64 ± 14 anys (mitja \pm desviació estàndar).

La PAS mitja i la PAD mitja eren de 157 ± 21 (120-200) i de 87 ± 9 (70-120) mm de Hg respectivament.

La creatinina mitja al moment del diagnòstic era de 2.6 ± 1 mg/dL i el temps mig fins a assolir l'HD (mesos) era 51.6 ± 38 (12-244). Els valors dels paràmetres analítics analitzats van ser els següents: calci sèric 8.9 ± 0.9 (5.6-10.8) mg/dL, fosfat sèric 4.7 ± 1.4 (2.7-9.2) mg/dL, PTH_i sèrica 286 ± 241 (11-1280) pg7mL, hematocrit 33 ± 6 (22-49) %, potassi sèric 4.7 ± 0.7 (3.3-7.1) mEq/L, colesterol total 225 ± 58 (100-42) mg/dL i triglicèrids 157 ± 86 (51-655) mg/dL. Les condicions clíniques registrades van ser: tabaquisme (n= 36, 35%), hiperlipèmia (n=31, 30%), hiperuricèmia (n=26, 25%) i DM (n=30, 29%, 7 amb DM tipus 1 i 23 amb DM tipus 2). Les etiologies de la IRC considerades van ser: NAS (n=35),

DM (n=21), GN (n=14), PQR (n=10), NIC (n= 5) i desconeguda (n=19), seguint una distribució semblant a la de la població general amb IRC.

Per a analitzar comparacions, els pacients es van agrupar en patologia glomerular (GN, DM) i patologia tubulintersticial (PQR, NIC).

Trenta-set pacients van presentar patologia CV: ACV (n=10), cardiopatia isquèmica (n=24) i patologia vascular perifèrica (n=14) (alguns pacients van presentar més d'un tipus de patologia CV).

5.3.2 CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques EN FUNCIÓ DELS DIFERENTS GENOTIPS:

5.3.2.1 POLIMORFISME M235T DEL GEN DE L'ANGIOTENSINOGEN – DADES CLÍNIC-BIOQUÍMIQUES

Tampoc hem trobat cap relació entre les dades clínic-analítiques i els diferents genotips del polimorfisme M235T de l'angiotensinògen, excepte per als nivells de creatinina al moment del diagnòstic.

Taula 9. Relació entre les dades clínic-bioquímiques i genotips del polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinògen.

	Angiotensinogen			
	TT	MT	MM	p
Edat (anys)	62 ± 14	62 ± 14	65 ± 13	0.44
Sexe (H/D)	21/17	24/12	15/13	0.48
Creatinina inicial (mg/dl)	2.6 ± 0.9	3.1 ± 1.2	2.2 ± 0.8	0.002
PAS (mmHg)	149 ± 20	158 ± 23	157 ± 18	0.24
PAD (mmHg)	85 ± 9	88 ± 11	86 ± 8	0.31
Temps fins a HD (mesos)	46 ± 31	55 ± 47	55 ± 38	0.51
Fumador (s/n)	11/27	16/20	9/19	0.34
Dislipèmia (s/n)	13/25	6/30	10/18	0.15
DM (s/n)	8/30	9/27	12/16	0.13
Patologia CV (s/n)	16/22	8/28	11/17	0.16

5.3.2.2 Polimorfisme I/D de l'ECA – dades clínic-bioquímiques

En quant al polimorfisme ID de l'ECA no varem trobar cap relació entre els diferents genotips i les dades clínic-analítiques.

Taula 10. Relació entre les dades clínic-bioquímiques i geotips del polimorfisme ID del gen de l'ECA.

	ECA I/D			p
	II	ID	DD	
Edat (anys)	63 ± 14	61 ± 14	64 ± 13	0.27
Sexe (H/D)	9/8	29/16	24/18	0.65
Creatinina (mg/dl)	inicial 3.1 ± 1.3	2.6 ± 1	2.5 ± 1	0.15
PAS (mmHg)	149 ± 20	158 ± 23	157 ± 18	0.24
PAD (mmHg)	85 ± 9	88 ± 11	86 ± 8	0.31
Temps fins a HD (mesos)	49 ± 32	52 ± 45	52 ± 33	0.97
Fumador (s/n)	5/12	12/33	19/23	0.17
Dislipèmia (s/n)	4/13	11/34	16/26	0.31
DM (s/n)	5/12	13/32	12/30	0.99
Patologia CV (s/n)	5/12	15/30	17/25	0.66

5.3.2.3 Polimorfisme A1166C del gen de l'AT1R – dades clínic-bioquímiques

En quant al polimorfisme del gen de l'AT1R, no hem trobat cap diferència significativa entre els paràmetres clínic-analítics i els diferents genotips, tot i que s'objectiva que els individus amb el genotip AA tenen una tendència a arribar abans a l'HD que els individus amb el genotip AC o CC (45 ± 31 mesos, 56 ± 44 mesos i 79 ± 38 mesos respectivament).

Taula 11. Relació entre les dades clínic-bioquímiques i genotips del polimorfisme A1166C del gen de l'AT1R.

	AT1R			
	CC	AC	AA	p
Edat (anys)	62 ± 19	65 ± 12	64 ± 15	0.78
Sexe (H/D)	4/1	27/17	31/24	0.56
Creatinina inicial (mg/dl)	2.8 ± 1.3	2.7 ± 1.2	2.6 ± 0.9	0.90
PAS (mmHg)	142 ± 15	156 ± 21	159 ± 21	0.21
PAD (mmHg)	88 ± 3	88 ± 11	86 ± 8	0.50
Temps fins a HD (mesos)	79 ± 38	56 ± 44	45 ± 31	0.086
Fumador (s/n)	1/4	16/28	19/36	0.76
Dislipèmia (s/n)	1/4	11/33	19/36	0.52
DM (s/n)	0/5	13/31	17/38	0.34
Patologia CV (s/n)	2/3	14/30	21/34	0.79

5.3.2.4 Polimorfismes del CYP11B2 – dades clínic-bioquímiques

Dins dels genotips del polimorfisme –344CT de l'aldosterona sintasa, solament varem trobar diferències significatives en els valors de creatinina inicial, de forma que els pacients amb el genotip CC presentaven uns valors més elevats de creatinina en el moment del diagnòstic respecte als pacients amb els genotips CT i aquest darrer grup també presentava valors superiors respecte al grup TT (3.1 ± 1.2 , 2.7 ± 1 i 2.2 ± 0.8 mg/dL respectivament, $p=0.02$).

Taula 12. Relació entre les dades clínic-bioquímiques i genotips dels polimorfismes –344CT i Wtcon del gen de l'aldosterona sintasa.

CYP11B2	-344CT				WTcon			
	CC	CT	TT	p	WTWT	WTcon	concon	p
Edat (anys)	62 ± 12	64 ± 13	66 ± 15	0.64	62 ± 13	65 ± 14	67 ± 13	0.49
Sexe (H/D)	11/5	34/24	17/13	0.70	11/13	41/21	10/8	0.21
Creat 1 (mg/dl)	3.1 ± 1.2	2.7 ± 1	2.2 ± 0.8	0.02	2.9 ± 1.2	2.7 ± 1.1	2.2 ± 0.8	0.17
PAS (mmHg)	164 ± 21	156 ± 19	155 ± 23	0.30	164 ± 23	155 ± 19	154 ± 23	0.19
PAD (mmHg)	88 ± 9	87 ± 9	87 ± 9	0.81	88 ± 12	86 ± 8	89 ± 8	0.64
Temps fins HD (mesos)	32 ± 20	53 ± 42	59 ± 34	0.06	45 ± 48	53 ± 36	54 ± 32	0.62
Fumador (s/n)	6/10	22/36	8/22	0.55	2/22	30/32	4/14	0.001
Dislipèmia (s/n)	4/12	15/43	12/18	0.35	6/18	16/46	9/9	0.12
DM (s/n)	4/12	16/42	10/20	0.79	8/16	16/46	6/12	0.71
Patologia (s/n)	CV 4/12	20/38	13/17	0.45	7/17	22/40	8/10	0.59

5.3.2.5 Polimorfismes del TGF- β 1- dades clínic-bioquímiques

En quant als polimorfismes del TGF- β 1, no varem trobar diferències en quant a les dades clínicas entre els difrents genotips excepte per la presència de patologia CV i el polimorfisme del codó 10, en que observarem un major risc de presentar events CV per als subjectes amb l'al.lel leu.

Taula 13. Relació entre les dades clínic-bioquímiques i genotips dels polimorfismes dels codons 10 i 25 del gen del TGF- β 1.

TGF- β 1	Arg25Pro			Leu10Pro			
	Arg/Arg	Arg/Pro	P	Leu/Leu	Leu/Pro	Pro/Pro	P
Edat (anys)	64 \pm 14	62 \pm 11	0.47	66 \pm 12	62 \pm 13	63 \pm 17	0.44
Sexe (H/D)	51/31	11/11	0.30	23/13	26/26	13/3	0.07
Creat 1 (mg/dl)	2.6 \pm 1	2.9 \pm 87	0.24	2.6 \pm 0.9	2.6 \pm 1	2.9 \pm 0.9	0.48
PAS (mmHg)	158 \pm 20	152 \pm 21	0.18	158 \pm 19	155 \pm 22	158 \pm 19	0.72
PAD (mmHg)	86 \pm 9	88 \pm 8	0.35	87 \pm 7	86 \pm 9	89 \pm 8	0.71
Temps fins HD (mesos)	53 \pm 38	45 \pm 36	0.41	50 \pm 30	49 \pm 32	63 \pm 36	0.43
Fumador (s/n)	31/51	5/17	0.19	12/24	17/35	7/9	0.71
Dislipèmia (s/n)	25/57	6/16	0.77	15/21	14/38	2/14	0.08
DM (s/n)	24/58	6/16	0.86	10/26	16/36	4/12	0.89
Patologia (s/n)	CV 30/52	7/15	0.68	18/18	18/34	1/15	0.01

5.3.3 ANÀLISI DE LA RELACIÓ AMB LA PENDENT DE PROGRESSIÓ I ELS DIFERENTS FACTORS CLÍNICS.

5.3.3.1 Relació entre l'etiologia de la patologia i la progressió

Els pacients del subgrup de nefropatia glomerular progressen més ràpids que els pacients amb nefropatia intersticial.

Taula 14. Relació entre etiologia de la nefropatia i velocitat de progressió.

Etiologia	Pendent
Nefroangiosclerosi	-0.0068 ↘
Diabetes Melitus	-0.0095 P=0.042
Glomerulonefritis	-0.0132 ↗
Poliquistosi	-0.0062
Intersticial	-0.0104
Desconeguda	-0.0075

5.3.3.2 Relació entre dades clinic-analítiques i progressió

Variables categòriques

Aquesta taula mostra les variables i els paràmetres bioquímics categòrics que varem seleccionar per l'anàlisi. Quan es consideren individualment, cap d'aquests paràmetres es troba associat amb la velocitat de progressió de la IR a la nostra mostra de pacients.

Taula 15. Relació entre les variables clíniques categòriques i la progressió. n^1 representa el nombre de pacients amb el factor de risc, i n^2 el nombre de pacients sense el factor de risc

Factor	n^1 / n^2	95% C.I.	P
Sexe	62/ 42	-0.354 – 0.171	0.490
Fumador	36/ 68	-0.214 – 0.329	0.676
Dislipèmia	31/ 73	-0.255 – 0.310	0.846
Hiperuricèmia	26/ 78	-0.571 – 0.016	0.063
DM	30/ 74	-0.052 – 0.511	0.109
IECA	29/ 75	-0.191 – 0.384	0.507

Variables contínues

Aquesta taula conté les variables i paremetres bioquímics continus i mostra que solament la PAS i la PTH_i sèrica correlacionen amb l'invers de la cretinina respecte al temps (R=0.31, R=-0.34, respectivament, p=0.004).

Taula 16. Relació entre les variables clínico-bioquímiques contínues i la progressió.

Factor	Pearson	P	Spearman	P
Edat	-0.139	0.160	-0.162	0.101
Calci	-0.143	0.148	-0.190	0.054
Fosfat	0.032	0.747	0.059	0.553
PTH_i	-0.340	<0.001	-0.281	0.004
Hematocrit	0.037	0.707	0.030	0.763
Potassi	-0.046	0.642	-0.054	0.585
PAS	0.313	0.001	0.277	0.004
PAD	0.088	0.374	0.012	0.905

Anàlisi multivariant

En el model multivariant, solament la PAS, la PTH_i sèrica i el polimorfisme A1166C del gen de l'AT1R estan independentment associats a la velocitat de progressió amb un interval de confiança del 95%. Les variables PTH_i sèrica i PAS contribueixen en un 18% mentre que la variable genètica contribueix en un 10% a la variabilitat total de la pendent.

Taula 17. Anàlisi multivariant per avaluar com intervenen les variables a la velocitat de progressió.

Variable	B 95%	CI P	P
PTH _i	-0.00091	-0.001- 0.000	0.001
PAS	0.0077	0.002- 0.013	0.006
AGTM235T	-0.322	-0.554- -0.090	0.007
AT1RA1166C	0.267	0.042- 0.491	0.021
Hiperuricèmia	0.278	0.012- 0.543	0.041

5.3.3.3 Relació entre dades clínic-bioquímiques i patologia cardiovascular

Característiques clíniques segons la presència o absència de patologia cardiovascular

Aquesta taula mostra l'anàlisi univariant dels factors de risc CV com a variables independents i la presència o absència de patologia CV com a variable dependent.

De les variables analitzades, a part del polimorfisme del codo 10, solament la DM i la dislipèmia influïren en la presència de patologia CV a la nostra mostra.

Taula 18. *Característiques clíniques en funció de la presència o no de patologia cardiovascular.*

	Malaltia CV	No malaltia CV	p
Edat	68 ± 9	62 ± 15	0.02
Sexe (M/F)	25/12	37/30	0.154
Fumador (S/N)	14/23	22/45	0.381
DM (S/N)	16/21	14/53	0.015
Dislipèmia (S/N)	18/19	13/54	0.002
PAS (mmHg)	156 ± 18	157 ± 22	0.847
PAD (mmHg)	86 ± 9	87 ± 9	0.444
Pendent 1/creat	-4.92 ± 0.64	-5.04 ± 0.67	0.365

Anàlisi de regressió logística

L'anàlisi de regressió logística demostrà que l'associació entre el polimorfisme del codó 10 del TGF- β 1 i la presència de patologia CV era independent. A més a més, solament la dislipèmia ($p=0.010$), la DM ($p=0.027$) i el polimorfisme del codó 10 ($p=0.039$) participen en el model de regressió logística com a factors predictors independents de malaltia CV en els pacients amb IRT.

Taula 19. Anàlisi de regressió logística per avaluar si les variables analitzades participen independentment o no en el fet de presentar patologia cardiovascular.

Variable	B	Exp (B)	IC 95% exp(B)	P
Dislipèmia	1.227	3.411	1.341 – 8.676	0.01
DM	1.079	2.941	1.129 – 7.660	0.027
Leu10 →Pro	2.248	9.467	1.116 – 80.285	0.039

6 DISCUSIÓ

6.1 SELECCIÓ DELS POLIMORFISMES DEL SRAA

S'han estudiat set polimorfismes genètics, cinc del SRAA i dos del TGF- β 1 per avaluar la seva influència en la IR i en la progressió de la IRC.

Simultàniament s'han estudiat altres variables clínic-analítiques que també poden influir en la progressió de la IRC.

El SRAA és un dels sistemes reguladors més investigats a l'hora d'estudiar la fisiopatologia de la progressió de la IR.

El fet de triar la majoria de gens del SRAA és degut a que l'increment de l'activitat del SRAA produeix vasoconstricció i increment de l'aldosterona i a més, l'excés d'angiotensina i d'aldosterona juguen un paper important en la progressió de les nefropaties a través de l'increment de la proteïnúria i de l'increment de la PA entre d'altres. Així mateix, la demostració recent de la presència de diferents components del SRAA a diferents teixits (ronyó, cor, vasos, etc) ha posat de manifest l'existència d'un SRAA local amb funcions paracrines, autocrines i intracrines, que es capaç d'actuar de forma independent del SRAA circulant (291-293) i que no és mesurable "in vivo". D'altra banda, l'evidència clínic de que els fàrmacs inhibidors del SRAA (IECA i ARA-II) són capaços de revertir la microalbuminúria, reduir la proteïnúria i frenar la progressió de la IR a diferents tipus de nefropaties (diabètica i no

diabètica) (159,165,166). També s'ha evidenciat que aquest efecte el produeixen de forma independent al seu efecte antihipertensiu. Finalment, he tingut en compte la predisposició individual a patir lesió d'òrgan diana en una malaltia com la HTA, en la qual malgrat assolir-se un bon control de la PA hi ha un 15% de pacients hipertensos que desenvolupen NAS i progressen cap a la IRT (2, 294).

La contribució del SRAA en la progressió de la IR no depèn de l'etiologia de la IR, sinó que probablement actua en els mecanismes comuns de la progressió de la patologia. Això explicaria que els beneficis del tractament amb IECA es donessin en IR de diferents etiologies (295) o que alguns polimorfismes del SRAA no estessin associats a algunes nefropaties particulars com és el cas de la PQR (296), o de la nefropatia IgA (297) o de la nefropatia diabètica (298).

6.2 SELECCIÓ DELS POLIMORFISMES DEL TGF- β 1

D'altra banda l'elecció dels polimorfismes del TGF- β 1 té sentit, donat que la fibrosi progressiva del teixit renal és una de les principals causes de pèrdua de funció renal. L'acumul de matriu mesangial associat a atrofia tubular i fibrosi intersticial són les característiques histològiques d'una IR progressiva, i són independents de l'etiologia de la nefropatia. La fibrosi tisular i en aquest cas del ronyó, s'ha vist associada als factors de creixement, especialment al TGF- β 1 (181).

A més a més, la inhibició del SRAA amb IECA o ARA-II frena la progressió de la IR, tot i que això és insuficient, fent pensar en l'existència d'altres factors que continuen actuant, com és el cas de les citocines o factors de creixement. A més a més, l'angiotensina II produeix els seus efectes a través dels factors de creixement. Una possible explicació vindria d'estudis practicats en animals, on s'ha vist que en rates amb reducció de la massa renal, el bloqueig del SRAA, frena la progressió de la nefropatia en alguns animals però no en altres. Aquest efecte incomplet per part d'aquests fàrmacs, correlaciona amb la no inhibició de l'expressió de gens profibròtics i proinflamatoris, regulada en part per l'angiotensina II. En aquest sentit, malgrat el bloqueig farmacològic, alguns dels gens regulats per l'angiotensina II no són inhibits, i això pot contribuir a la progressió de la IR. En aquest sentit, prendrien força els tractaments destinats a la inhibició d'aquests mediadors parcialment inhibits. En un futur proper els inhibidors de les citocines podrien ser útils en el control de la progressió de les patologies cròniques. Fins al moment actual, el TGF- β ha sigut bloquejat exitosament mitjançant l'administració d'anticossos neutralitzants al ronyó i a la pell (299,300). Les modificacions en el gen del TGF- β 1 s'han associat a diferències en la secreció, producció o activitat d'aquesta citocina (301) i hi ha publicacions recents que han demostrat associacions entre polimorfismes del TGF- β 1 i IAM, nefropatia diabètica, nefropatia IgA, control de la PA i nivells sèrics de TGF- β 1 (277,280-285).

El fet de triar els dos polimorfismes del TGF- β 1 del total dels vuit polimorfismes descrits és degut al següent:

- El polimorfisme Arg25 \rightarrow Pro correspon a un canvi d'un aminoàcid gran polar per un altre aminoàcid petit hidrofòbic a l'extrem 3'del centre hidrofòbic i possiblement pot afectar l'exportació de la pre-pro-teïna del TGF- β 1 (302).
- El polimorfisme Leu 10 \rightarrow Pro es troba localitzat a la posició 29 de la seqüència peptídica, que es creu que transporta proteïna recent sintetitzada cap al reticle endoplasmàtic (303).

6.3 ESTUDI DE LA VELOCITAT DE PROGRESSIÓ COM A TRET FENOTÍPIC HETEROGENI

Quan s'estudia un tret fenotípic heterogeni, com és la velocitat de progressió de la IR en el que intervenen probablement diferents gens i factors ambientals, és molt important seleccionar adequadament la població que s'inclourà a l'estudi.

La possibilitat de detectar una associació entre una determinada variant d'un gen i un tret fenotípic o malaltia depèn de com a mínim 4 factors:

1. Nombre d'individus estudiats. Com més gran sigui la mostra estudiada, més potència tindrà el fet de trobar una associació entre un determinat gen i una malaltia.

-
2. Heterogeneïtat clínica i genètica de la malaltia. En el nostre estudi ens trobem davant un tret fenotípic heterogeni.
 3. Desequilibri d'associació entre el "locus" marcador i el "locus" de la malaltia.
 4. Capacitat informativa del marcador, que depèn del nombre i de la freqüència d'al·lels a la població.

Les bases genètiques de la HTA o d'una patologia com la IRC i la seva progressió són complexes. Tot i que s'han descrit i estudiat diferents factors ambientals que intervenen en la progressió de la IR, es creu que la predisposició individual és un factor determinant en la progressió de la IR. En el moment actual es coneix molt poc sobre els gens implicats en la progressió de la IR, del seu grau d'influència en la progressió, de la seva interacció amb altres gens i factors ambientals.

Malgrat que les variacions en diferents gens han demostrat una associació amb la HTA i la progressió de la IRC en alguns estudis, aquestes associacions sovint no són reproduïbles (304-307). Aquests resultats inconsistents es poden explicar en part per la subsegüent troballa de que el polimorfisme ID està en desequilibri de lligament amb els 17 altres polimorfismes d'un sol nucleotid del gen de l'ECA (308). També hi ha algun estudi que troba aquesta associació entre el genotip DD i la HTA en homes, però no en dones (245). Alguns d'aquests polimorfismes d'un sol nucleotid poden tenir significació funcional i

les seves freqüències poden variar significativament entre diferents grups ètnics. En un altre exemple, el polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinògen mostra una associació amb la HTA en diversos estudis amb europeus i japonesos però no en estudis en americans d'origen africà (239,309,310). També s'ha trobat aquest polimorfisme associat a HTA en un metanàlisi de Kunz R et al. amb un risc relatiu de 1.3 (311). Finalment, algunes variants polimorfiques del gen del AT1R s'han vist associades a HTA en un estudi finlandès (257), mentre que aquesta associació no s'ha pogut demostrar en americans d'origen africà (312,313).

Probablement les alteracions genètiques entre múltiples locus (més que no les variacions en un únic gen) són les implicades en les bases genètiques de la HTA tal i com van demostrar Williams et al. en el seu estudi (314). Pontremoli et al.(287) van demostrar que els individus amb la combinació dels genotips ACEDD, AT1RCC i ATGTT tenien un major risc de desenvolupar dany orgànic per la HTA. Un sol polimorfisme, en el millor dels casos, determina un risc relatiu de 1.2-1.4 i per tant, al ser tant baix és molt difícil de detectar.

Els polimorfismes del SRAA també s'han trobat associats en alguns estudis a progressió cap a la IRT (244,254,289,315-317) mentre que aquesta associació no s'ha trobat en altres estudis (267,288,296,297). A part de les diferències racials i de que múltiples locus hi puguin estar implicats; en la majoria d'estudis no s'ha tingut en compte altres factors clínics i bioquímics rellevants per la progressió de la IR.

Cal tenir en compte en aquests tipus d'estudis, que no solament estem analitzant el gen candidat, sinó també tota una regió d'un cromosoma on s'hi poden trobar altres gens diferents. Per tant, els resultats atribuïts a un determinat gen poden ser deguts a un gen contigu en el mateix cromosoma. Tot i així, això no resta valor als polimorfismes estudiats, donat que igualment ens poden servir com a marcadors genètics de la patologia estudiada.

6.4 ANÀLISI DE LA DISTRIBUCIÓ DELS GENOTIPS EN PACIENTS AMB IRT I EN CONTROLS

La distribució dels genotips entre pacients amb IRT i controls també va ser significativament diferent en els polimorfismes Arg25Pro del TGF- β 1 i WT/conv del CYP11B2.

En quant a la troballa d'una major prevalència de l'al·lel leu del polimorfisme del codó 10 del gen del TGF- β 1 en els pacients afectes d'IRT, concorda amb el treball de Brezzi et al., que analitza la severitat del dany histològic en la nefropatia IgA i objectiva un major dany histològic en els pacients portadors de l'al·lel leu del codó 10 del TGF- β 1 (284). Mentre que no coincideix amb l'estudi realitzat per Wong et al., que troba una correlació entre l'al·lel pro del codó 10 del TGF- β 1 i la presència de nefropatia en una població de diabètics xinesos, i a més ho associa a una pitjor funció renal i a una major prevalència de proteïnúria (318). Els altres 2 polimorfismes (WT/conv del

CYP11B2 i ArgPro del codó 25 del gen del TGF- β 1) no s'han analitzat en relació amb la presència de nefropatia i/o IRT.

En aquest estudi no hem trobat cap relació entre l'al·lel D de l'ECA i la presència de IRT, que és una de les troballes més consistents a la majoria dels estudis (253,287,290,315).

6.5 ANÀLISI DE LA PROGRESSIÓ CAP A LA IRT SEGONS ELS DIFERENTS GENOTIPS

6.5.1 ANÀLISI DE LA SUPERVIVÈNCIA EN FUNCIÓ DE CADA GENOTIP

Malgrat que per a l'estudi de la progressió de la IR he analitzat el temps fins arribar a l'HD, temps de duplicació de la creatinina, corbes de supervivència i pendent de l'invers de creatinina respecte al temps, sols he tingut en compte a l'hora d'analitzar la progressió la pendent de 1/creatinina respecte al temps, perquè el fet de ser un estudi retrospectiu va fer que em trobés amb pacients amb graus molt diferents de IR, de forma que els resultats de les corbes de supervivència no són del tot valorables.

En aquest estudi solament he trobat diferències estadísticament significatives en quant a les corbes de supervivència pel polimorfisme -344CT de l'aldosterona sintasa, essent els pacients amb el genotip CC els que triguen menys temps en arribar a la IRT (31.9 mesos), respecte

als pacients amb els genotips CT i TT (52.9 i 59.4 mesos respectivament).

Malgrat l'associació entre el polimorfisme -344CT i HTA (271,272) i HVE (270), els estudis realitzats per Lovati et al. i Wong et al. no troben cap relació entre aquest polimorfisme i una evolució més ràpida cap a la IRT (289,318).

6.5.2 ANÀLISI DE LA RELACIÓ ENTRE LA PENDENT DE LA IR I ELS GENOTIPS

Una dada interessant de l'estudi és la troballa estadísticament significativa d'una progressió més ràpida cap a la IRT en els genotips AA del polimorfisme A1166C del gen ATR1. Aquesta associació no s'havia descrit prèviament, i en altres estudis s'ha correlacionat el genotip CC amb la HTA. Una possible explicació per aquesta associació seria que la nefropatia hipertensiva o NAS generalment progressa més lentament cap a la IR que les altres nefropaties, tal i com també s'ha vist en aquest estudi, en que els pacients amb NAS progressaven més lentament cap a la IRT, sobretot quan els comparava amb la patologia glomerular.

En el cas del polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinògen en que els pacients homozigots del nostre estudi (MM o TT) mostren una major velocitat de progressió cap a la IRT, no hi trobem cap explicació lògica,

ja que normalment les associacions amb un determinat fenotip solen donar-se amb un al·lel determinat de forma que els homozigots per aquell al·lel tendiran a presentar més el fenotip que es heterozigots i que els homozigots de l'altre al·lel.

L'al·lel T del polimorfisme M235T del gen de l'angiotensinògen s'ha vist associat a una progressió més ràpida cap a la IRT en pacients amb nefropatia IgA (235), i en GN (289).

En la nostra població estudiada, el polimorfisme ID de la ECA no intervé en la progressió més ràpida cap a la IRT ni amb la presència de IR; al igual com ja ha succeït amb altres estudis (288,289). Es probable que si s'hagués inclòs un major nombre de pacients i controls s'haguess pogut trobar una associació entre el genotip DD de la ECA i la presència de IR i/o la progressió de la IR cap a la IRT.

Respecte als resultats trobats en els altres estudis que avaluen la influència de diferents polimorfismes del TGF- β 1 en la progressió, en aquest estudi no he trobat concordances, tot i que hi ha molts factors que poden influir-hi, entre ells la mida de la mostra, el fet de que l'estudi sigui prospectiu-retrospectiu, el fet d'avaluar simultàniament mes o menys variables i el fet de que es tracti de pacients amb diferents graus d'IR.

Quan he intentat buscar associacions entre diferents gens, he vist que l'associació entre el polimorfisme A1166C del gen del AT1R i el polimorfisme -344CT de l'aldosterona sintasa, seria l'associació que afavoriria una progressió més ràpida cap a la IRT.

Lovati et al. va analitzar l'existència d'interaccions entre els polimorfismes de l'angiotensinògen, ECA i de l'aldosterona sintasa, i va objectivar que en pacients amb el genotip TT de l'angiotensinògen que associaven el genotip DD de l'ECA eren els que progressaven més ràpid cap a la IRT (289).

6.6 AVALUACIÓ DE LES DADES CLÍNIC-ANALÍTQUES I LA SEVA INFLUÈNCIA SOBRE LA PROGRESSIÓ DE LA IR

El fet d'analitzar simultàniament les diferents variables clínic-analítiques amb els diferents polimorfismes era per veure si les diferents variables actuaven de forma conjunta o independent, i per assegurar-nos que l'associació entre un determinat polimorfisme i la progressió cap a la IRT no estava influenciada per cap altra variable clínic-analítica, atribuint-li a aquell polimorfisme un valor que realment no li corresponia.

De les variables clínic-analítiques estudiades en la progressió de la IR, he objectivat que a la nostra població, l'etiologia de la nefropatia (sobretot la DM), la PAS (xifres tensionals més elevades) i la PTH_i (xifres de PTH_i sèrica més baixes), són les que intervenen de forma independent en la progressió de la IR.

6.6.1 RELACIÓ ENTRE ETIOLOGIA DE LA NEFROPATIA I PROGRESSIÓ

En quant a l'etiologia de la nefropatia, es va objectivar que els pacients amb nefropatia glomerular presentaven una major velocitat de progressió respecte als que presentaven nefropaties intersticials, la qual cosa ja era d'esperar.

El grup que progressa més ràpid és el de pacients amb GN, sobretot respecte al grup de la NAS. En aquest sentit Jungers et al. van analitzar els diferents factors que influeixen en la velocitat de progressió de la IRC en la nefropatia no diabètica i van objectivar que l'etiologia és un dels principals determinants en la velocitat de progressió, essent més ràpids els pacients amb GN, seguits dels pacients amb PQ, NAS i finalment dels pacients amb NIC (que són els que van més lents) (52).

6.6.2 RELACIÓ ENTRE LA PA SISTÒLICA I PROGRESSIÓ

L'altre dada clínica que es correlaciona amb la majoria dels estudis, i ja ha estat àmpliament estudiada, és l'associació entre xifres de PAS més elevades i una progressió més ràpida cap a la IRT (33,34). Dels estudis més recents, Pei et al. objectiva que els pacients amb nefropatia IgA amb velocitats més ràpides de progressió són els que tenen una PA mitja més elevada a la primera visita i a la darrera visita de l'estudi (235). Un altre exemple és l'estudi de Maouz et al. , que segueix els factors que influeixen la progressió de la IRC en els dos darrers anys abans de l'HD, trobant que la PA és el factor que influeix en una progressió més ràpida (319).

6.6.3 RELACIÓ ENTRE PTH SÈRICA I PROGRESSIÓ

Ens va sobtar però l'associació entre uns nivells sèrics de PTH_i més baixos amb una velocitat de progressió més ràpida, donat que en la majoria dels estudis s'ha descrit que l'hiperparatiroidisme mal controlat podria afavorir una progressió més ràpida cap a la IRT (320). Una possible explicació a aquesta troballa és el fet de que hi ha algun tipus de nefropatia com la diabètica que es caracteritza per una progressió més ràpida cap a la IRT, mentre que l'hiperparatiroidisme es desenvolupa més lentament en aquests pacients respecte a altres nefropaties (321,322).

6.6.4 RELACIÓ ENTRE TRACTAMENT AMB IECA-ARA-II I PROGRESSIÓ

Una de les variables clíniques que vaig analitzar donada la seva relació directa amb el SRAA, va ser el tractament amb IECA o ARA II per part dels pacients. Els IECA i els ARA II exerceixen un efecte beneficiós en el curs de les diferents malalties renals: GN, nefropatia diabètica i NAS (3). A la majoria dels casos l'ús de fàrmacs inhibidors del SRAA s'acompanya d'una disminució de la proteinúria i fins i tot s'ha demostrat un efecte renoprotector amb la disminució del grau de progressió de la IR. Quan s'administra un IECA s'objectiva que l'efecte antiproteinuric s'incrementa gradualment arribant a un màxim a les 4 setmanes de tractament. Mentre que els canvis hemodinàmics són immediats i romanen estables durant el temps que dura el tractament (323).

En aquest estudi no es va trobar cap relació entre l'administració d'IECA o ARA II i una progressió més lenta cap a la IR, encara que això s'hauria d'analitzar junt amb els altres factors modificables amb aquests fàrmacs. Una altra explicació és que hi havia pocs pacients que haguessin estat tractats amb aquests fàrmacs dins de la nostra població.

6.7 RELACIÓ ENTRE PATOLOGIA CARDIOVASCULAR I POLIMORFISME DEL TGF- β

En quant a l'associació del polimorfisme del codó 10 del gen del TGF- β amb la patologia CV (definida com a presència de com a mínim un episodi d'AVC, de cardiopatia isquèmica o de vasculopatia perifèrica) concorda amb el treball de Yokota et al. (291). He vist que en la malaltia CV a la nostra població de pacients també hi influïen altres variables clínic-analítiques tal com la presència de dislipèmia i DM, tot i que hi participaven de forma independent. Al igual que la progressió de la IR, la presència de malaltia CV també és una patologia complexa, multifactorial i poligènica que també resulta de la interacció entre factors ambientals i factors genètics (324,325).

A més, els principals factors clínics i demogràfics associats amb un risc renal augmentat són també factors de risc ben establerts per la morbiditat i mortalitat CV. Aquesta concordança pot reflexar la semblança de les vies

fisiopatològiques de la glomeruloesclerosi i fibrosi intersticial progressives amb el procés d'aterosclerosi (326).

Els pacients amb patologia renal tenen un particular elevat risc per morbiditat i mortalitat CV, no solament quan desenvolupen una IRT (327), sinó en fases incipients de la nefropatia (328). El risc augmentat s'ha atribuït no solament a factors presents a la població sense patologia renal (demogràfics, tabac, HTA, hiperlipèmia), sinó també a factors específics per les nefropaties. En aquest sentit, la proteinúria ha demostrat ser un potent factor de risc CV (329,330).

Tot i així, alguns individus amb patologia CV no presenten cap dels factors de risc convencionals, el que suggereix la contribució dels factors genètics. Els darrers avanços en epidemiologia genètica han revelat que algunes variants genètiques augmenten el risc de patologia vascular coronària, incloent el polimorfisme de l'ECA (257), apolipoproteïna E (331) i de la glicoproteïna IIb/IIIa de les plaquetes (332). D'altra banda s'ha observat un increment de l'expressió del ARNm del TGF- β 1 en lesions reestenòtiques d'humans després de l'angioplastia, el qual és responsable de l'acúmulo de colagen en aquestes lesions fibromusculars (333).

En un estudi es va objectivar que en pacients amb patologia coronària severa, la concentració de TGF- β 1 va ser una cinquena part que en individus amb artèries coronàries normals (334). En canvi en un altre estudi es va veure que la concentració de TGF- β 1 actiu estava més augmentada en pacients amb patologia coronària que en controls i que la concentració d'aquesta citocina era

proporcional a la severitat de la patologia coronària (335).

Cada cop hi ha més estudis que associen variants polimòrfiques del TGF- β 1 a patologia CV, algun concordant amb el nostre estudi (282), altres amb troballes diferents (277).

6.8 COMENTARI FINAL

En definitiva, tant la patologia renal com la patologia CV són multifactorials, influenciades per múltiples factors ambientals i genètics que interactuen entre ells afavorint la rapidesa i el grau de progressió de la patologia, on el SRAA i els factors de creixement hi juguen un paper molt important, i que en un futur serà d'interès tenir identificats aquells individus amb marcadors genètics que condicionen a patir una determinada patologia o a que aquesta progressi més ràpid, per poder inferir en tractar els factors modificables de forma més intensiva en aquella població més susceptible.

Malgrat ser de naturalesa retrospectiva, aquest estudi és consistent amb el fet de que tant una disregulació en el SRAA o en la síntesi de TGF- β , probablement, en part a través de polimorfismes genètics, pot ser important en la gènesi de la fibrosi renal i d'altres teixits, contribuint d'aquesta manera al desenvolupament de IR avançada i de complicacions CV, que molt freqüentment es troben associades a aquesta patologia.

7 CONCLUSIONS

1. Hi ha una associació entre l'al·lel leu del codó 10, l'al·lel pro del gen del TGF- β 1, i el polimorfisme WT del gen de l'aldosterona sintasa i la presència de IRC terminal, comparant amb controls sans.
2. De tots els gens estudiats solament influencien en la progressió de la IR de forma aïllada, en la nostra mostra, el polimorfisme A1166C del gen del AT1R. Aquesta associació continua essent significativa després d'ajustar-ho per les covariables clíniques i analítiques rellevants.
3. Altres paràmetres que també intervenen en la progressió en la nostra població de malalts són l'etiologia de la nefropatia, la PTH_i i la PAS. Això posa de manifest la importància que té avaluar d'altres variables clínic-analítiques en els estudis que analitzen els factors de risc genètics i analitzar si hi intervenen de forma independent o no.
4. Un altra conclusió important d'aquest estudi és la troballa d'una relació significativa entre l'al·lel Leu del codó 10 i la presència de patologia CV en la població d'HD estudiada, subratllant el seu potencial ús com a marcador de risc CV en els malalts amb IRT.

8 BIBLIOGRAFIA

1. Coresh J, Wei GL, McQuillan G, Brancati FL, Levey AS, Jones C, Klag MJ: Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med* 161: 1207-1216, 2001.
2. Rostand SG, Brown G, Kirk KA, Rutsky EA, Dustan HP: Renal insufficiency in treated essential hypertension. *N Engl J Med* 320: 648-688, 1989.
3. Rosenberg ME, Smith LJ, Correa-Rotter R, Hostetter TH: The paradox of the Renin-Angiotensin system in chronic renal disease. *Kidney Int* 45: 403-410, 1994.
4. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P: The angiotensin-converting enzyme inhibition in the progressive renal insufficiency study group: effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Eng J Med* 334: 939-945, 1996.
5. Locatelli F, Marcelli D, Comelli M, Alberti D, Graziani G, Buccianti G, Redaelli B, Giangrande A: Proteinuria and blood pressure as casual components of progression to end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 11: 461-467, 1996.
6. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352: 837-853, 1998
7. Perry Jr HM, Miller P, Fornoff JR, Baty JD, Sambhi MP, Rutan G, Moskowitz DW, Carmody SE: Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patients. *Hypertension* 25: 587-594, 1995.
8. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, Stamler J: Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Eng J Med* 334: 13-18, 1996.

9. Buckalew VM Jr, Berg RL, Wang SR, Porush JG, Rauch S, Schulman G: Prevalence of hypertension in 1975 subjects with chronic renal disease study baseline cohort. Modification of diet in Renal Disease Study Group. *Am J Kidney Dis* 28: 811-821, 1996.
10. Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE, Benditt EP: Structural-functional correlations in renal disease II: The correlations. *Hum pathol* 1: 631-641, 1970.
11. Mc Innes G: Los antagonistas de la angiotensina II. Science Press. Londres 1998.
12. Tamaki K, Okuda S, Nakayama M, Yanagida T, Fujishima M: TGF beta 1 in hypertensive renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol* 7: 2578-2589, 1996.
13. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA: Expression of TGF-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 49: 461-469, 1996.
14. Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM: Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol* 241: F85-F93, 1981.
15. Mogensen CE, Christensen CK: Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 311:89-93, 1984.
16. Vora JP, Dolben J, Dean JD, Thomas D, Williams JD, Owens DR, Peters JR: Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 41:829-835, 1992.
17. Nelson RG, Tan M, Beck GJ, Bennett PH, Knowler WC, Mitch WE, Blouch K, Myers BD: Changing glomerular filtration with progression from impaired glucose tolerance to type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 42: 90-93, 1999.
18. Anderson S, Vora JP: Current concepts of renal hemodynamics in diabetes. *J Diabetes Complications* 9: 304-307, 1995.
19. Briggs J: The macula sensing mechanism for tubuloglomerular feedback. *Fed Proc* 40: 87, 1981
20. Imanishi M, Yoshioka K, Konishi Y, Okumura M, Okada N, Sato T, Tanaka S, Fujii S, Kimura G: Glomerular hypertension as one cause of albuminuria in type II diabetic patients. *Diabetologia* 42: 999-1005, 1999.

-
21. Novick AC, Gephardt G, Guz B, Steinmuller D, Tubbs RR: Long-term follow-up after partial removal of a solitary kidney. *N Engl J Med* 325: 1058-1062, 1991.
 22. Bohle A, Muller GA, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Xiao JC: Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. *Kidney Int Suppl.* 54: S2-S9, 1996.
 23. Bohle A, Von Gise H, Mackensen-Haen S, Stark-Jakob B: The obliteration of the postglomerular capillaries and its influence upon the function of both glomeruli and tubuli: functional interpretation of morphologic findings. *Klin Wochenschr* 59: 1043-1051, 1981.
 24. Largo R, Gomez-Garre D, Soto K, Marron B, Blanco J, Gazapo RM, Plaza JJ, Egido J: Angiotensin-converting enzyme is upregulated in the proximal tubules of rats with intense proteinuria. *Hypertension* 33: 732-739, 1999.
 25. Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Flores C, Egido J: Tubular NF- κ B and AP-1 activation in human proteinuric renal disease. *Kidney Int* 60: 1366-1377, 2001.
 26. Benigni A, Remuzzi G: How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression. *Am J Kidney Dis* 37 Suppl 2: S21-S24, 2001.
 27. Bergstrom J, Alvestrand A, Bucht H, Gutierrez A: Stockholm clinical study on progression of chronic renal failure-an interim report. *Kidney Int* 36 Suppl: S110-S114, 1989.
 28. Walser M: Weighted least squares regression analysis of factors contributing to progression of chronic renal failure. *Contrib Nephrol* 75: 127-133, 1989.
 29. Wright JP, Salzano S, Brown CB, el Nahas AM: Natural history of chronic renal failure: A reappraisal. *Nephrol Dial Transplant* 7: 379-383, 1992.
 30. Locatelli F, Alberti D, Graziani G, Buccianti G, Redaelli B, Giangrande A, Marcelli D, Francucci BM: Factors affecting chronic renal failure progression: Results from a multicentre trial. *Miner Electrolyte Metab* 18: 295-302, 1992.
 31. Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A: Understanding the nature of renal disease progression: In proteinuric nephropathies enhanced glomerular protein traffic contributes to interstitial inflammation and renal scarring. *Kidney Int* 51:2-15, 1997.

32. Hebert L, Agarwal G, Sedmak DD, Mahan JD, Becker W, Nagaraja HN: Proximal tubular epithelial hyperplasia in patients with chronic glomerular proteinuria. *Kidney Int* 57: 1962-1967, 2000.
33. Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, Striker G: The effects of dietary protein restriction and blood pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N Eng J Med* 330: 877-884, 1994.
34. Kasiske BL: Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 84: 985-992, 1988.
35. Bentzel CJ: The filtered complement hypothesis (letter). *Kidney Int* 58: 2597-2598, 2000.
36. Harris RC, Cheng HF: The intrarenal renin-angiotensin system: a paracrine system for the local control of renal function separate from the systemic axis. *Exp Nephrol* 4: 2-7, 1996.
37. Navar LG, Imig JD, Zou L, Wang CT: Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol* 17: 412-422, 1997.
38. Rerolle JP, Hertig A, Nguyen G, Sraer JD, Rondeau EP: Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potential target in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 58: 1841-1850, 2000.
39. Goligorsky MS, Chen J, Brodsky S: Endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy: focus on nitric oxide. *Hypertension* 37:744-748, 2001.
40. Schmidt RJ, Baylis C: Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 58: 1261-1266, 2000.
41. Schini VB, Durante W, Elizondo E, Scott-Burden T, Junquero DC, Schafer AI, Vanhoutte PM: The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TFG- β 1, PDGF-AB and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 216: 379-383, 1992.
42. Lee LK, Meyer TW, Pollock As, Lovett DH: Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the remnant kidney. *J Clin Invest* 96: 953-964, 1995.
43. Markewitz BA, Michael JR, Kohan DE: Endothelin-1 inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 272: L1078-L1083, 1997.

-
44. Yu HT: Progression of chronic renal failure. *Arch Intern Med* 163: 1417-1429, 2003.
 45. Dussaule JC, Tharaux PL, Boffa JJ, Fakhouri F, Ardaillou R, Chatziantoniou C: Mechanisms mediating the renal profibrotic actions of vasoactive peptides in transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 11: S124-S128, 2000.
 46. Park JB, Schiffrin EL: ET(A) receptor antagonist prevents blood pressure elevation and vascular remodeling in aldosterone-infused rats. *Hypertension* 37: 1444-1449, 2001.
 47. Ballew JR, Fink GD: Role of endothelin ETB receptor activation in angiotensin-II induced hypertension: effects of salt intake. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2218-H2225, 2001.
 48. Tang WW, Ulich TR, Lacey DL, Hill DC, Qi M, Kaufman SA, Van GY, Tarpley JE, Yee JS: Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Pathol* 148: 1169-1180, 1996.
 49. Tang WW, Van GY, Qi M: Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 51: 926-931, 1997.
 50. Hannedouche T, Chauveau P, Kalou F, Albouze G, Lacour B, Jungers P: Factors affecting progression in advanced chronic renal failure. *Clin Nephrol* 39: 312-320, 1993.
 51. Polito C, La Manna A, Olivieri AN, Cartiglia ML, Bonomo G, Ditoro A, Todisco N, Delgado R: Progression of chronic renal failure. *Child Nephrol Urol* 11: 91-95, 1991.
 52. Jungers P, Hannedouche T, Itakura Y, Albouze G, Descamps-Latscha B, Man NK: Progression rate to end-stage renal failure in non-diabetic kidney diseases: a multivariate analysis of determinant factors. *Nephrol Dial Transplant* 10: 1353-1360, 1995.
 53. Silbiger SR, Neugarten J: The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 25: 515-533, 1995.
 54. Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, Jones RH: Factors affecting the progression of renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 41: 1311-1319, 1992.

55. Davison AM, Cameron JS, Kerr DN, Ogg CS, Wilkinson RW: The natural history of renal function in untreated idiopathic membranous glomerulonephritis in adults. *Clin Nephrol* 22: 61-67, 1984.
56. Rekola S, Bergstrand A, Bucht H: Deterioration of GFR in Ig A nephropathy as measured by ⁵¹Cr-EDTA clearance. *Kidney Int* 40: 1050-1054, 1991.
57. Miller JA, Anacta LA, Cattran DC. Impact of gender on the renal response to angiotensin II. *Kidney Int* 55: 278-285, 1999.
58. Zdunek M, Silbiger S, Lei J, Neugarten J. Protein kinase CK2 mediates TGF- β 1-stimulated type IV collagen gene transcription and its reversal by estradiol. *Kidney Int* 60: 2097-2108, 2001.
59. Hunsicker LG, Adler S, Gaggiola A: Predictors of the progression of renal disease in the Modification of Diet in Renal Disease Study. *Kidney Int* 51: 1908-1919, 1997.
60. Walker WG, Hermann J, Anderson J: Racial differences in renal protective effect of enalapril vs hydrochlorothiazide in randomized doubly blinded trial in hypertensive NIDDM. *J Am Soc Nephrol* 4: 310, 1993. Abstract.
61. Vaziri ND, Liang K, Parks JS. Down regulation of hepatic lecithin-cholesterol acyltransferase gene expression in chronic renal failure. *Kidney Int* 59: 2192-2196, 2001.
62. Samuelsson O, Mulec H, Knight-Gibson C, Attman PO, Kron B, Larsson R, Weiss L, Wedel H, Alaupovic P: Lipoprotein abnormalities are associated with increased rate of progression of human chronic renal insufficiency. *Nephrol Dial Transplant* 12: 1908-1915, 1997.
63. Oda H, Keane WF: Recent advances in statins and the kidney. *Kidney Int Suppl* 71: S2-S5, 1999.
64. Joles JA, Kunter U, Janssen U, Kriz W, Rabelink TJ, Koomans HA, Floege J: Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. *J Am Soc Nephrol* 11: 669-683, 2000.
65. Oda H, Keane WF: Lipids in progression of renal disease. *Kidney Int Suppl* 62: S36-S38, 1997.
66. Hebert L, Cody R, Slivka A, Sedmak D: Hypertension-Induced Kidney, Heart, and Central Nervous System Disease. Diagnosis and management of Renal Disease and Hypertension. Durham, Carolina Medical Press, 1994.

-
67. Orth SR, Stockmann A, Conradt C, Ritz E, Ferro M, Kreuzer W, Piccoli G, Rambašek M, Roccatello D, Dchafer K, Sieberth HG, Wanner C, Watschinger B, Zucchelli P: Smoking as a risk factor for end-stage renal failure in men with primary renal disease. *Kidney Int* 54: 926-931, 1998.
68. Ritz E, Stefanski A: Diabetic nephropathy in type II diabetes. *Am J Kidney Dis* 27:167-194, 1996.
69. Brancati FL, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Stamler J, Klag MJ. Risk of end-stage renal disease in diabetes mellitus: a prospective cohort study of men screened for MRFIT: Multiple Risk Factor Intervention Trial. *JAMA* 278: 2069-2074, 1997.
70. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I: Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 324: 1149-1155, 1991.
71. Hoogeveen EK, Kostense PJ, Jager A, Heine RJ, Jakobs C, Bouter LM, Donker AJ, Stehouwer CD: Serum homocysteine level and protein intake are related to risk of microalbuminuria: The HOORN Study. *Kidney Int* 54: 203-209, 1998.
72. Lau K: Phosphate excess and progressive renal failure: The precipitation-calcification hypothesis. *Kidney Int* 36: 918-937, 1989.
73. Fine LG, Orphanides C, Norman JT: Progressive renal disease: The chronic hypoxia hypothesis. *Kidney Int Suppl* 65: S74-S78, 1998.
74. Lucas SR, Costa Silva VL, Miraglia SM, ZaladeK Gil F: Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. *Pediatr Nephrol* 11: 719-723, 1997.
75. Jones SE, Nyengaard JR, Flyvbjerg A, Bilous RW, Marshall SM: Birth weight has no influence on glomerular number and volume. *Pediatr Nephrol* 16: 340-345, 2001.
76. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I: Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 58: 770-773, 2000.
77. Lackland DT, Egan BM, Fan ZJ, Syddall HE: Low birth weight contributes to the excess prevalence of end-stage renal disease in African Americans. *J Clin Hypertens* 3: 29-31, 2001.

78. Perneger TV, Klag MJ, Whelton PK: Recreational drug use : a neglected risk factor for end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 38: 49-56, 2001.
79. Norris KC, Thornhill-Joynes M, Robinson C, Strickland T, Alperson BL, Witana SC, Ward HJ: Cocaine use, hypertension, and end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 38: 523-528, 2001.
80. Bakris G, Smith A: Effects of sodium intake on albumin excretion in patients with diabetic nephropathy treated with long-acting calcium antagonists. *Ann Intern Med* 125: 201-204, 1996.
81. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM: Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney Int* 59: 1498-1509, 2001.
82. Buckingham R, Al-Barazanji K, Toseland C et al: Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonista, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes* 47:1326-1334, 1998
83. Schlondorff D: Renal complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Kidney Int* 44: 643-653, 1993.
84. Cremer W, Bock K: Symptoms and causes of chronic hypokalemia nephropathy in man. *Clin Nephrol* 7: 112, 1977.
85. Ray P, Mc Cune B, Gomez R: Renal vascular induction of TGF- β 2 and rennin by potassium depletion. *Kidney Int* 44:1006-1013, 1993.
86. Mitch WE: Measuring the rate of progression of renal insufficiency. In Mitch WE (ed): The progressive nature of renal disease, 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, 1992, pp203-222.
87. Mitch WE, Walser M, Buffington GA, Lemann J Jr: A simple method of stimating progression of chronic renal failure. *Lancet* 2: 1326-1328, 1976.
88. Shah BV, Levey AS: Spontaneous changes in the rate of decline in reciprocal serum creatinine: errors in predicting the progression of renal disease from extrapolation of the slope. *J Am Soc Nephrol* 2: 1186-1191, 1992.
89. Jones RH, Molitoris BA: A statistical method for determining the breakpoint of two lines. *Anal Biochem* 141: 287-290, 1984.

-
90. Coresh J, Walser M, Hill S: Survival on dialysis among chronic renal failure patients treated with a supplemented low-protein diet before dialysis. *J Am Soc Nephrol* 6: 1379-1385, 1995.
 91. Walser M, Drew HH, La France ND: Reciprocal creatinine slopes often give erroneous estimates of progression of chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* 27: S81-S85, 1989.
 92. Maroni BJ, Mitch WE: Role of nutrition in prevention of the progression of renal disease. *Annu Rev Nutr* 17: 435-455, 1997.
 93. Levey AS, Gassman JJ, Hall PM, Walker WG: Assessing the progression of renal disease in clinical studies: effects of duration of follow-up and regression to the mean. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group. *J Am Soc Nephrol* 1: 1087-1094, 1991.
 94. Mathillias O, Attman PO, Aurell M, Delin K, Granerus G: Conflicting results between glomerular filtration rate and serum creatinine measurements in chronic renal failure. *Contrib Nephrol* 53: 71-73, 1986.
 95. Walser M, Drew HH, La France ND: Creatinine measurements often yielded false estimates of progression in chronic renal failure. *Kidney Int* 34: 412-418, 1988.
 96. Cockcroft DW, Gault MH: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16: 31-41, 1976.
 97. Levey AS, Bosch JP, Lewis BJ, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 130: 461-470, 1999.
 98. Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GD, Group MS: A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine (abstract). *J Am Soc Nephrol* 11: A0828, 2000.
 99. Bosch JP: Renal reserve: a functional view of glomerular filtration rate. *Semin Nephrol* 15: 381-385, 1995.
 100. Sawicki PT: Stabilization of glomerular filtration rate over 2 years in patients with diabetic nephropathy under intensified therapy regimens. *Nephrol Dial Transplant* 12: 1890-1899, 1997.

101. Toto RD, Mitchell HC, Smith RD, Lee HC, McIntire D, Pettinger WA: "Strict" blood pressure control and progression of renal disease in hypertensive nephrosclerosis. *Kidney Int* 48: 851-859, 1995.
102. Mullins JJ, Peters J, Ganten D: Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2-gene. *Nature* 344: 541-544, 1990.
103. Arai M, Wada A, Isaka Y, Akagi Y, Sugiura T, Miyazaki M, Moriyama T, Kaneda Y, Naruse K, Naruse M: In vivo transfection of genes for renin and angiotensinogen into the glomerular cells induced phenotypic change of the mesangial cells and glomerular sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 206: 525-532, 1995.
104. Jeunemaitre X, Ménard J, Clauser E, Corvol P: Angiotensin: molecular biology and genetics. En Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Raven Press, New York, 1995: pp1653-1665.
105. Ron D, Brasier AR, Wright KA, Tate JE, Habener JF: An inducible 50-kilodalton NF kappa B-like protein and a constitutive protein both bind the acute-phase response element of the angiotensinogen gene. *Mol Cell Biol* 10: 1023-1032, 1990.
106. Deschepper CF, Hong-Brown LQ: Hormonal regulation of the angiotensinogen gene in liver and other tissues. In: Raizada MK, Philips MI, Sumners C, eds. Cellular and molecular biology of the renin angiotensin system. Boca Raton, FL: CRC Press; 1993: pp149-166
107. Herrmann HC, Dzau VJ. The feedback regulation of angiotensinogen production by components of the renin angiotensin system. *Circ Res* 52: 328-334, 1983.
108. Jeunemaitre X, Ménard J, Clauser E, Corvol P: Angiotensinogen: Molecular Biology and Genetics. In: Laragh J, Brenner BM eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 1995: pp1653-1665.
109. Morris BJ: Molecular biology of renin I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10: 209-214, 1992.
110. Laragh JH, Sealey JE: Renin-angiotensin-aldosterone system and the renal regulation of sodium, potassium, and blood pressure homeostasis. In windhager EE (de): Handbook of Physiology, Sect 8, Renal Physiology, Oxford University Press, New York, 1991, pp 1409-1541.

-
111. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burell LM, Risvanis J, Cooper ME: Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* 41: 392-397, 2003.
112. Chai SY, Johnston CI: Tissue Distribution of Angiotensin-Converting Enzyme. In Laragh J and Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Second Edition. Raven Press, Ltd., New York, 1995: pp1683-1693.
113. Schelling P, Fisher H, Ganten D. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 9: 3-15, 1991.
114. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ: Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1419-1424, 1989.
115. Naftilan AJ, Pratt RE, Eldridge CS, Lin HL, Dzau VJ: Angiotensin II induces C-fos expression in smooth muscle via transcriptional control. *Hypertension* 13: 706-711, 1989.
116. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ : Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 91: 2268-2274, 1993.
117. Delafontaine P, Lou H: Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268: 16866-16870, 1993.
118. Barnes JM, Barnes NM, Costall B, Coughlan J, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM, Williams TJ: Angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin, and cognition. *J Cardiovasc Pharmacol* 19: S63-S71, 1992.
119. Sealey JE, Laragh JH: The renin-angiotensin-aldosterone system for the normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In Laragh JH, Brenner BM (eds): Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and management, 2on de. Raven Press, New York, 1995, pp 1763-1797.
120. Taal MW, Brenner BM: Renoprotective benefits of RAS inhibition: from ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57: 1803-1817, 2000.
121. Dzau VJ: Cell biology and genetics of angiotensin in cardiovascular disease. *J Hipertens* 12: S3-S10, 1994.

122. Mulrow PJ: The intrarenal renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2: 41-44, 1993.
123. Seikali MG, Arant BS Jr, Seney FD Jr: Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 86: 1352-1357, 1990.
124. Ichikawa I, Harris RC: Angiotensin actions in the kidney: renewed insight into the old hormone. *Kidney Int* 40: 583-596, 1991.
125. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17: 626-635, 1991.
126. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ: Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia. Autocrine transforming growth factor- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 90: 456-461, 1992.
127. Campbell-Boswell M, Robertson AL Jr: Effects of angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp Mol Pathol* 35: 265-276, 1981.
128. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK: Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 62: 749-756, 1988.
129. Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a renal growth factor. *J Am Soc Nephrol* 3: 1531-1540, 1993.
130. Ray PE, Bruggeman LA, Horikoshi S, Aguilera G, Klotman PE: Angiotensin II stimulates human fetal mesangial cell proliferation and fibronectin biosynthesis by binding to AT1 receptors. *Kidney Int* 45: 177-184, 1994.
131. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA: Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β -expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437, 1994.
132. Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG: Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 140: 95-107, 1992.
133. Gerald SK, Neilson EG, Haverty TP: Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 45: 515-524, 1994.

-
134. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM: Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19: 464-474, 1992.
135. Timmermans PB, Carini DJ, Chiu AT. In Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology and management. New York: Raven Press; 1990, pp 2351-2360.
136. Criscione L, de Gasparo M, Buehlmayer P, Whitebread S, Ramjouw HP, Wood JM: Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT1-receptor subtype. *Br J Pharmacol* 110 : 761-771, 1993.
137. Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR, Himmelsbach RJ, Chucholowski A, Connolly CJ, Neergaard SJ, Van Nieuwenhze MS, Sebastian A, Quin J 3rd: Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT2 subtype. *J Med Chem* 34: 3248-3260, 1991.
138. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M: Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 284-291, 1989.
139. Steckelings VM, Obermuller N, Bottari SP, Qadri FI, Veltmar A, Unger T: Brain angiotensin: receptors, actions and possible role in hypertension. *Pharmacol Toxicol* 70: 523-527, 1992.
140. Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D: The rennin-angiotensin system in the brain: an update 1993. *Regul Pept* 46: 487-509, 1993.
141. Tsutsumi K, Stromberg C, Viswanathan M, Saavedra JM: Angiotensin II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. *Endocrinology* 129: 1075-1082, 1991.
142. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE: Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88: 921-933, 1991.
143. Tsutsumi K, Saavedra JM: Increased dithiothreitol-insensitive, type 2 angiotensin II receptors in selected brain areas of young rats. *Cell Mol Neurobiol* 11: 295-299, 1991.
144. Cook VI, Grove KL, Mc Menamin KM, Carter MR, Harding JW, Speth R: The AT2 angiotensin receptor subtype predominates in the 18 day gestation fetal rat brain. *Brain Res* 560: 334-336, 1991.

145. Dzau VJ, Mukoyama M, Partt RE: Molecular biology of angiotensin receptors: target for drug research? *J Hypertens Suppl 12*: S1-S5, 1994.
146. Carey RM, Wang Z-Q, Siragy HM: Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension 35*:155-163, 2000.
147. Greene EL, Kren S, Hostetter TH: Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest 98*:1063-1068, 1996.
148. Delyani JA: Mineralocorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. *Kidney Int 57*: 1408-1411, 2000.
149. Brilla CG, Weber KT: Mineralocorticoid excess, dietary sodium and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med 120*: 893-901, 1992.
150. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J: Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *J Clin Invest 93*: 2578-2583,1994.
151. Wakisaka M, Spiro MJ, Spiro RG: Synthesis of type IV collagen by cultured glomerular cells and comparison of its regulation by glucose and other factors with that of type IV collagen. *Diabetes 43*: 95-103, 1994.
152. Walker WG. Hypertension related renal injury: a major contributor to end stage renal disease. *Am J Kidney Dis 22*: 164-173, 1993.
153. Berl T, Katz FH, Henrich WL, de Torrente A, Schrier RW: Role of aldosterone in the control of sodium excretion in patients with advanced chronic renal failure. *Kidney Int 14*: 228-235,1978.
154. Hene RJ, Boer P, Koomans HA, Mees EJ: Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease. *Kidney Int 21*: 98-101,1982.
155. Quan ZY, Walser M, Hill GS: Adrenalectomy ameliorates ablative nephropathy in the rat independently of corticosterone maintenance level. *Kidney Int 41*: 326-333, 1992.
156. Gavras H, Brunner HR, Laragh JH, Vaughan ED Jr, Koss M, Cote LJ, Gavras I: Malignant hypertension resulting from deoxycorticosterone acetate and salt excess: Role of renin and sodium in vascular changes. *Circ res 36*: 300-309,1975.
157. Olson JL: Role of heparin as a protective agent following reduction of renal mass. *Kidney Int 25*: 376-382, 1984.

-
158. Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr: Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 31: 451-458, 1998.
159. Taal MW, Brenner BM: Renoprotective benefits of RAS inhibition: From ACEI to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57: 1803-1817, 2000.
160. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, Matalone M, Pisoni R, Gaspari F, Remuzzi G: Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet* 349:1857-1863, 1997.
161. Ruggenenti P, Perna A, Gherardi G, Garini G, Zoccali C, Salvadori M, Scolari F, Schena FP, Remuzzi G: Renoprotective properties of ACE-inhibition in non-diabetic nephropathies with non-nephrotic proteinuria. *Lancet* 354: 359-364, 1999.
162. Lewis J, Berl T, Bain RP, Rohde RD, Lewis EJ: Effect of intensive blood pressure control on the course of type 1 diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 34: 809-817, 1999.
163. Wilmer WA, Hebert LA, Lewis EJ, Rohde RD, Whittier F, Cattran D, Levey AS, Lewis JB, Spitalowitz S, Blumenthal S, Bain RP: Remission of the nephrotic syndrome in type 1 diabetes: long-term follow-up of patients in the Captopril Study. *Am J Kidney Dis* 34: 308-314, 1999.
164. Ruggenenti P, Perna A, Benini R, Bertani T, Zoccali C, Maggiore O, Salvadori M, Remuzzi G: In chronic nephropathies prolonged ACE inhibition can induce remission: Dynamics of time-dependent changes in GFR. *J Am Soc Nephrol* 10: 997-1006, 1999.
165. Tarif N, Bakris GL: Angiotensin II receptor blockade and progression of nondiabetic-mediated renal disease. *Kidney Int Suppl* 52: S67-S70, 1997.
166. Brenner BM, Cooper ME, Zeeuw, Grunfeld JP, Keane WF, Kurokawa F, McGill JB, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Ribeiro AB, Schluchter MD, Snavely D, Zhang Z, Simps R, Shahinar S, Renal Study Investigators: The losartan renal protection study-rationale, study design and baseline characteristics of RENAAL (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan). *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1: 328-335, 2000.
167. Hebert LA, Falkenhain ME, Nahman NS, Cosio FG, O'Dorisio TM: Combination ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist therapy in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 19: 1-6, 1999.

168. Heeg JE, De Jong PE, Van Der Hem GK, de Zeeuw D: Reduction of proteinuria by angiotensin converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 32: 78-83, 1987.
169. Brown NJ, Nakamura S, Ma L, Nakamura I, Donnert E, Freeman M, Waughan DE, Fogo AB: Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 58: 1219-1227, 2000.
170. Russo D, Pisani A, Balletta MM, De Nicola L, Savino FA, Andreucci M, Minutolo R: Additive antiproteinuric effect of converting enzyme inhibitor and losartan in normotensive patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 33: 851-856, 1999.
171. Pitt B: "Escape" of aldosterone production in patients with left ventricular dysfunction treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor: implications for therapy. *Cardiovasc Drugs Ther* 9:145-149, 1995.
172. Struthers AD: Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail* 2: 47-54, 1996.
173. Borghi C, Boschi S, Ambrosioni E, Melandri G, Branzi A, Magnani B: Evidence of a partial escape of RAA blockade in patients with acute MI treated with ACE inhibitors. *J Clin Pharmacol* 33: 40-45, 1993.
174. Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren LJ, Amery A: Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *J Endocrinol* 91: 457-465, 1981.
175. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT: Role of mineralocorticoids in renal injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 32: 598A, 1998 (abstr).
176. Hasan F, Weinberg EO, Delyani J, Friedrich G, Converso K, Douglas PS, Lorell BH: Aldosterone and cardiac hypertrophy: Effects of espirorenone on LV function and hypertrophic remodeling in LV pressure overload. *Circulation* 100: SI565A, 1999 (supp I, abstr).
177. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H: Vascular aldosterone: biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269: 24316-24320, 1994.

-
178. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Movas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C: Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 273: 4883-4891, 1998.
179. Horiuchi M, Nishiyama H, Hama J, Takenaka T, Kondo H, Kino H, Nagata S, Sugimura K, Katori R: Characterization of renal aldosterone receptors in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 264: F286-F291, 1993.
180. Davidson JM. Wound repair. In: Gallin Ji, Goldstein MI, Snyderman R, eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 2nd de. New York: Raven Press, 1992:pp 809-19.
181. Border WA, Ruoslahti E: Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90: 1-7, 1992.
182. Sporn MB, Roberts AB: Autocrine secretion- 10years later. *Ann Intern Med* 117: 408-14, 1992.
183. Nathan C, Sporn MB: Cytokines in context. *J Cell Biol* 113: 981-6, 1991.
184. Roberts AB, Sporn MB. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor- β (TGF- β). *Growth factors* 8: 1-9, 1993.
185. Roberts AB, Sporn MB: Differential expression of the TGF- β isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* 32: 91-98, 1992.
186. Roberts AB, Sporn MB. The transforming growth factor- β . In Sporn MB, Roberts AB, eds. *Peptide growth factors and their receptors*. Vol.95 of handbook of experimental pharmacology. New York: Springer-Verlag, 1990: pp 419-472.
187. Ebner R, Chen RH, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R: Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262: 900-902, 1993.
188. Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J: Betaglycan can act as a dual modulator of TGF- β acces to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124: 557-568, 1994.
189. Kim SJ, Park K, Koeller D, Kim KY, Wakefield LM, Sporn MB, Roberts AB: Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J Biol Chem* 267: 13702-13707, 1992.

190. Ruoslahti E: Integrins. *J Clin Invest* 87: 1-5, 1991.
191. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB: Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 10: 1492-1497, 1990.
192. Border WA, Noble NA: Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-1292, 1994.
193. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS: Transgenic mice with increased plasma levels of transforming growth factor beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74: 991-1003, 1996.
194. Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M: In vivo hyperexpression of TGF beta 1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 63: 1037-1039, 1997.
195. Shihab FS, Tanner AM, Shao Y, Weffer MI: Expression of TGF beta 1 and matrix proteins is elevated in rats with chronic rejection. *Kidney Int* 50: 1904-1913, 1996.
196. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor β 1. *Nature* 346: 371-374, 1990.
197. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW: Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β . *Lancet* 339: 213-214, 1992.
198. Giri SN, Hyde DM, Hollinger MA: Effect of antibody to transforming growth factor β on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. *Thorax* 48: 959-966, 1993.
199. Logan A, Berry M, Gonzalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A: Effects of transforming growth factor β 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 6: 355-363, 1994.
200. Wahl SM, Allen JB, Costa GL, Wong HL, Dasch JR: Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor β . *J Exp Med* 177: 225-230, 1993.

-
201. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E: Antibodies against transforming growth factor β 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 93: 1172-1178, 1994.
202. Ebner R, Chen R-H, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R: Determination of type 1 receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262:900-902, 1993.
203. Roberts AB, Sporn MB: Mechanistic interrelationships between two superfamilies; The steroid/retinoid receptors and transforming growth factor- β . *Cancer Surv* 14: 205-220, 1992.
204. Okuda S, Nakamura T, Yamamoto T, Ruoslahti E, Border WA: Dietary protein restriction rapidly reduces transforming growth factor β 1 expression in experimental glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9765-9769, 1991.
205. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Natural inhibitor of transforming growth factor - β protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360: 361-364, 1992.
206. Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH: Fluid shear stress induces endothelial TGF-beta 1 transcription and production: Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* 95: 1363-1369, 1997.
207. Horikoshi S, McCune BK, Ray PE, Kopp JB, Sporn MB, Klotman PE: Water deprivation stimulates TGF-beta2 accumulation in the yuxtaglomerular apparatus of mouse kidney. *J Clin Invest* 88: 2117-2122, 1991.
208. Antonipillai I, Le TH, Soceneantu L, Horton R: TGF-beta is a renin secretagogue at picomolar concentrations. *Am J Physiol* 265: F537-F541, 1993.
209. Kagami S, Kuhara T, Okada K, Kuroda Y, Border WA, Noble NA: Dual effects of angiotensin II on the plasminogen/plasmin system in rat mesangial cells. *Kidney Int* 51: 664-671, 1997.
210. Pimentel JL, Sundell CL, Wang S, Kopp JB, Montero A, Martinez-Maldonado M: Role of angiotensin II in the expression and regulation of TGF-beta in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 48: 1233-1246, 1995.
211. Ohta K, Kim S, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Takaori K, Iwao H: Role of angiotensin II in extracellular matrix and TGF-beta 1 expression in hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 269: 115-119, 1994.

212. Egido J: Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* 49: 578-597, 1996.
213. Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ: Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nature Genetics* 12: 44-51, 1996.
214. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J: Familial clustering of diabetic kidney disease: Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 320: 1161-1165, 1989.
215. Klouda PT, Manos J, Acheson EJ, Dyer PA, Goldby FS, Harris R, Lawler W, Mallick NP, Williams G: Strong association between idiopathic membranous glomerulopathy and HLA-DRW3. *Lancet* 2: 770-771, 1979.
216. Egido J, Julian BA, Wyatt RJ: Genetic factors in primary Ig A nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2: 134-142, 1987.
217. Glicklich D, Haskell L, Senitzer D, Weis RA: Possible genetic predisposition to idiopathic focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 12: 26-30, 1988.
218. Spray BJ, Atassi NG, Tuttle AB, Freedman BI: Familial risk, age at onset, and cause of end-stage renal disease in white Americans. *J Am Soc Nephrol* 5: 1806-1810, 1995.
219. Oriola J: Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev Diag Biol* 40: 31-34, 1991.
220. Morris BJ: Identification of essential hypertension genes. *J Hypertens* 11: 115-120, 1992.
221. Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russel RP, Hermann J: Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1: 287-291, 1979.
222. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, Connor JM, Lever AF, Fraser R: Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertens* 10: 473-482, 1992.

-
223. Gardes J, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J: Role of angiotensinogen in blood pressure homeostasis. *Hypertension* 4: 185-189, 1982.
224. Menard J, El Amrani AIK, Savoie F, Bouhnik J: Angiotensinogen: an attractive and underrated participant in hypertension and inflammation. *Hypertension* 18: 705-707, 1991.
225. Campbell DJ, Habener JF: Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 78: 31-39, 1986.
226. Ohkubo H, Kawakami H, Kakehi Y, Takumi T, Arai H, Yokota Y, Iwai M, Tanabe Y, Masu M, Hata J: Generation of transgenic mice with elevated blood pressure by introduction of the rat renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5153-5157, 1990.
227. Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B, Metzger R, Hilgenfeldt V, Zimmermann F, Jacob H, Fuxe K, Ganten D, Kaling M: High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *EMBO J* 11: 821-827, 1992.
228. Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM: Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic in situ hybridization. *Genomics* 8: 598-600, 1990.
229. Fukamizu A, Takahashi S, Seo MS, Tada M, Tanimoto K, Uehara S, Murakami K: Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter. *J Biol Chem* 265: 7576-7582, 1990.
230. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM: Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensinogen. *Cell* 71: 169-180, 1992.
231. Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM: A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 99: 1786-1797, 1997.
232. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJ: Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med* 330: 1629-1633, 1994.

233. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Ricard S, Poirer O, Parving HH: Angiotensinogen gene polymorphisms in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetes* 45: 367-369, 1996.
234. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S: Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 345: 1600-1603, 1995.
235. Pei Y, Scholey J, Thai K, Suzuki M, Cattran D: Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in caucasian patients. *J Clin Invest* 100: 814-820, 1997.
236. 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* 86: 1343-1346, 1990.
237. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F: Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 51: 197-205, 1992.
238. Villard E, Tiret L, Visvikis S, Rakotovo R, Cambien F, Soubrier F: Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study by two-QTL segregation linkage-analysis. *Am J Hum Genet* 58: 1268-1278, 1996.
239. Zee RY, Lou YK, Griffiths LR, Morris BJ: Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 9-15, 1992.
240. Morise T, Takeuchi Y, Takeda R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism and essential hypertension. *Lancet* 343: 125, 1994.
241. Forrester T, McFarlane-Anderson N, Bennet F, Wilks R, Puras A, Cooper R, Rotimi C, Durazo R, Tewksbury D, Morrison L: Angiotensinogen and blood pressure among blacks findings from a community survey in Jamaica. *J Hypertens* 14: 315-321, 1996.
242. Schmidt S, van Hooff IM, Grobbee D, Ganten D, Ritz E: Polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens* 11: 345-348, 1993.

-
243. Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC: The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 21: 455-460, 1993.
244. Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogihara T: Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 399-404, 1993.
245. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D: Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not in women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 97: 1766-1772, 1998.
246. Shunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA: Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 330: 1634-1638, 1994.
247. Mattu RK, Needham EW, Galton DJ, Frangos E, Clark AJ, Caufield M: A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. *Circulation* 91: 270-274, 1995.
248. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A. Deletion Polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644, 1992.
249. Castellano M, Muiesan ML, Rizzoni D, Beschi M, Pasini G, Cinelli A, Salvetti M, Porteri E, Bettoni G, Kreutz R, Lindpaintner K, Agabiti Rosei E. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population: The Vobarno Study. *Circulation* 91: 2721-2724, 1995.
250. Catto A, Carter AM, Barrett JH, Stickland M, Bamford J, Davies JA, Grant PJ: Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and cerebrovascular disease. *Stroke* 27: 435-440, 1996.
251. Dudley CR, Keavney B, Stratton IM, Turner RC, Ratcliffe PJ: UK prospective Diabetes Study XV: Relationship of renin-angiotensin system gene polymorphisms with microalbuminuria in NIDDM. *Kidney Int* 48: 1907-1911, 1995.

252. Harden PN, Geddes C, Rowe PA, McIlroy JH, Bulton-Jones M, Rodger RS, Junor BJ, Briggs JD, Connell JM, Jardine AG: Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 345: 1540-1542, 1995.
253. Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Coll E, Darnell A, Rivera F, Revert L: Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism in essential hypertension and nephroangiosclerosis. *Kidney Int* 53:1743-1747, 1998.
254. Pérez-Oller L, Torra R, Badenas C, Milà M, Darnell A: Influence of the ACE gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 34: 273-278, 1999.
255. Morgan L, Crawshaw S, Baker PN, Edwards R, Pipkin FB, Kalsheker N: Functional and genetic studies of the angiotensin II type 1 receptor in pre-eclamptic and normotensive pregnant women. *Journal of Hypertension* 15: 1389-1396, 1997.
256. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tired L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69, 1994.
257. Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J, Koskenvuo M, Syvanen AC, Vartiainen E, Peltonen L, Kontula K: Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension* 33: 844-849, 1999.
258. Tomino Y, Makita Y, Shike T, Gohda T, Haneda M, Kikkawa R, Watanabe T, Baba T, Yoshida H: Relationship between polymorphism in the angiotensinogen, angiotensin-converting enzyme or angiotensin II receptor and renal progresión in japanesse NIDDM patients. *Nephron* 82: 139-144, 1999.
259. Nalogowska-Glosnicka K, Lacka BI, Zychma MJ, Grzeszczak W, Zukowska-Szzechowska E, Poreba R, Michalski B, Kniazewski B, Rzempoluch J, PIH Study Group: Angiotensin II type 1 receptor gene A1166C polymorphism is associated with the increased risk of pregnancy-induced hypertension. *Med Sci Monit* 6: 523-529, 2000.
260. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F: Influence of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 94: 698-703, 1996.

-
261. Osterop AP, Kofflard MJ, Sandkuijl LA, ten Cate FJ, Krams R, Schalekamp MA, Danser AH: AT1 receptor A/C1166 gene polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 32: 825-830, 1998.
262. Van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJ, van Gilst WH: Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension* 35: 717-721, 2000.
263. Curnow KM, Tusie-Luna MT, Pascoe L, Natarajan R, Gu JL, Nadler JL, White PC: The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol Endocrinol* 5: 1513-1522, 1991
264. Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC: Characterization of two genes encoding human steroid 11-beta-hydroxylase (P-450 (11) beta). *J Biol Chem* 264: 20961-20967, 1989.
265. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Rosler A, White PC: Mutations in the human CYP11B2 (aldosterone synthase) gene causing corticosterone methyloxidase II deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4996-5000, 1992.
266. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, Lalouel JM. A chimaeric 11-beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* 355: 262-265, 1992.
267. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR jr, Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC, Murhaghan DJ, Kaufman C, Stockigt JR, Ulick S, Lalouel JM. Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplications and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nat Genet* 2: 66-74, 1992.
268. Pascoe L, Curnow KM, Slutsker L, Connell JM, Speiser PW, New MI, White PC. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11B1 and CYP11B2. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8327-8331, 1992.
269. White PC, Slutsker L. Haplotype analysis of CYP11B2. *Endocr Res* 21: 437-442, 1995.

270. Kupari M, Hautanen A, Lankinen L, Koskinen P, Virolainen J, Nikkila H, White PC: Associations between human aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphisms and left ventricular size, mass and function. *Circulation* 97: 569-575, 1998.
271. Davies E, Holloway CD, Ingram MC, Inglis GC, Friel EC, Morrison C, Anderson NH, Fraser R, Connell JM: Aldosterone excretion rate and blood pressure in essential hypertension are related to polymorphic differences in the aldosterone synthase gene CYP11B2. *Hypertension* 33: 703-707, 1999.
272. Tamaki S, Iwai N, Tsujita Y, Kiroshita M: Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese. *Hypertension* 33: 266-270, 1999.
273. Hengstenberg C, Holmer SR, Mayer B, Lowel H, Engel S, Hense HW, Riegger GA, Schunkert H: Evaluation of the aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism in patients with myocardial infarction. *Hypertension* 35: 704-709, 2000.
274. Hautanen A, Toivanen P, Manttari M, Tenkanen L, Kupari M, Manninen V, Kayes KM, Rosenfeld S, White PC: Joint effects of an aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction. *Circulation* 100: 2213-2218, 1999.
275. Derynck R, Rhee L, Chen EY, Van Tilburg A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor- β precursor gene. *Nucleic Acids Res* 15: 3188-3189, 1987.
276. Kim SJ, Glick A, Sporn MB, Roberts AB: Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor β 1 gene. *J Biol Chem* 264: 402-408, 1989.
277. Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O: Polymorphisms of the transforming growth factor- β 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 28: 881-887, 1996.
278. 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* 8: 93-97, 1999.

-
279. Lario S, Iñigo P, Campistol JM, Poch E, Rivera F, Oppenheimer F: Restriction enzyme-based method for transforming growth factor- β 1 genotyping: nonisotopic detection of polymorphisms in codons 10 and 25 and the 5'-flanking region. *Clinical Chemistry* 45: 1290-1292, 1999.
280. Li B, Khanna A, Sharma V, Singh T, Suthanthiran M, August P: TGF- β 1 DNA polymorphisms, protein levels and blood pressure. *Hypertension* 33: 271-275, 1999.
281. Pociot F, Hansen PM, Karlsen AE, Langdahl BL, Johannesen J, Nerup J: TGF-beta 1 gene mutations in insulin-dependent diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 9: 2302-2307, 1998.
282. Yokota M, Ichihara S, Lin TL, 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* 101: 2783-2787, 2000.
283. Akai Y, Sato H, Ozaki H, Iwano M, Dohi Y, Kanauchi M: Association of transforming growth factor-beta1 T29C polymorphism with the progression of diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 38: S182-S185, 2001.
284. Brezzi B, Brugnara M, Lupo A, Magistroni R, Furci L, Ligabue G, Bernich P, Turco A, Gomez-Lira M, Del Prete D, Maschio G: Genetic polymorphisms of TGFbeta1 and histological damage in IgA nephropathy. *JASN vol 13*: pp131A, 2002. (abstract)
285. Brezzi B, Lupo A, Brugnara M, Ligabue G, Magistroni R, Marcantoni C, Gomez-Lira M, Gambaro G, Turco A, Poli A, Maschio G: TGFbeta1 COD10 polymorphism is associated with progressive IgA nephropathy. *JASN vol 13*: pp130A, 2002. (abstract)
286. Williams SM, Addy JH, Phillips JA 3rd, Dai M, Kpodonu J, Afful J, Jackson H, Joseph K, Eason F, Murray MM, Epperson P, Aduonum A, Wong LJ, Jose PA, Felder RA: Combinations of variations in multiple genes are associated with hypertension. *Hypertension* 36: 2-6, 2000.
287. Pontremoli R, Ravera M, Viazzi F, Nicoletta C, Berruti V, Leoncini G, Giacomelli F, Bezante GP, Sacchi G, Ravazzolo R, Deferrari G: Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system and organ damage in essential hypertension. *Kidney Int* 57: 561-569, 2000.
288. Zoccali C: ACE and α -adducin genotypes and renal disease progression. *Nephrol Dial Transplant* 15: 69-71, 2000.

289. Lovati E, Richard A, Frey BM, Frey FJ, Ferrari P: Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease. *Kidney Int* 60: 46-54, 2001.
290. Wang JG, Staessen JA, Tizzoni L, Brand E, Birkenhager WH, Fagard R, Herrmann SM, Bianchi G: Renal function in relation to three candidate genes. *Am J Kidney Dis* 38: 1158-1168, 2001.
291. Paul M, Wagner J, Dzau VJ: Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polimerase chain reaction. *J Clin Invest* 91: 2058-2064, 1993.
292. Hirsch AT, Talsness CE, Schunkert H, Paul M, Dzau VJ: Tissue-specific activation of cardiac angiotensin converting enzyme in experimental heart failure. *Circ Res* 69: 475-482, 1991.
293. Lindpaintner K, Jin M, Wilhelm MJ, Suzuki F, Linz W, Schoelkens BA, Ganten D. Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role. *Circulation* 77: 118-123, 1988.
294. Ruilope LM, Alcazar JM, Hernandez E, Moreno F, Martinez MA, Rodicio JL. Does an adequate control of blood pressure protect the kidney in essential hypertension? *J Hypertens* 8: 525-531, 1990.
295. Bernadet-Monrozies P, Rostaing L, Kamar N, Durand D: The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the progression of chronic renal failure. *Presse Med* 31: 1714-1720, 2002.
296. Saggar- Malik AK, Afzal AR, Swissman JS, Bland M, Sagnella GA, Eastwood JB, MacGregor GA, Jeffery S: Lack of association of ACE/angiotensinogen genotype with renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Gene Test* 4: 299-303, 2000.
297. Suzuki S, Suzuki Y, Kobayashi Y, Harada T, Kawamura T, Yoshida H, Tomino Y: Insertion/deletion polymorphism in ACE gene is not associated with renal progression in Japanese patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 35: 896-903, 2000.
298. Kunz R, Bork JP, Fritsche J, Ringel J, Sharma AM: Association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 9: 1653-1663, 1998.

-
299. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW: Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β . *Lancet* 339: 213-214, 1992.
300. Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, Nakamura H, Kaneda Y, Imai E, Hori M: Transforming growth factor-beta antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 58: 1885-1892, 2000.
301. El-Gamel A, Awad M, Sim E, Hasleton P, Yonan N, Egan J, Deiraniya A, Hutchinson IV: Transforming growth factor- β 1 and lung allograft fibrosis. *Eur J Cardiothorac Surg* 13 : 424-430, 1998.
302. Benson SA, Hall MN, Silhavy TJ: Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli* K12. *Annu Rev Biochem* 54: 101-134, 1985.
303. Verner K, Schatz G: Protein translocation across membranes. *Science* 241: 1307-1313, 1988.
304. Duru K, Farrow S, Wang J-M, 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* 7: 759-762, 1994.
305. Barley J, Blackwood A, Miller M, Markandu ND, Carter ND, Jeffery S, Cappuccio FP, MacGregor GA, Sagnella GA: Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J Hum Hypertens* 10: 31-35, 1996.
306. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM: Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1: 72-75, 1992.
307. Schmidt S, van Hooft IM, Grobbee DE, Ganten D, Ritz E: Polymorphism of the angiotensin I converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens* 11: 345-348, 1993.
308. Rieder MJ, Taylor SL, Clark AG, Nickerson DA: Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet* 22: 59-62, 1999.
309. Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel JM: 3Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest* 93: 1285-1287, 1994.

310. Rotimi C, Morrison L, Cooper R, Oyejide C, Effiong E, Ladipo M, Osotemihen B, Ward R: Angiotensinogen gene in human hypertension. Lack of an association of the 235 T allele among African Americans. *Hypertension* 24: 591-594, 1994.
311. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM: Association between the angiotensinogen 235T variant and essential hypertension in whites: a systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 30: 1331-1337, 1997.
312. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tired L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69, 1994.
313. Gainer JV, Hunley TE, Kon V, Nadeau JH, Muldowney JA 3rd, Brown NJ: Angiotensin II type 1 receptor polymorphism in African American lower frequency of the C1166 variant. *Biochem Mol Biol Int* 43: 227-231, 1997.
314. Williams SM, Addy JH, Phillips JA 3rd, Dai M, Kpodonu J, Afful J, Jackson H, Joseph K, Eason F, Murray MM, Epperson P, Aduonum A, Wong LJ, Jose PA, Felder RA: Combinations of variations in multiple genes are associated with hypertension. *Hypertension* 36: 2-6, 2000.
315. McLaughlin KJ, Harden PN, Ueda S, Boulton-Jones JM, Connell JM, Jardine AG: The role of genetic polymorphisms of angiotensin-converting enzyme in the progression of renal diseases. *Hypertension* 28: 912-915, 1996.
316. Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, Alhenc-Gelas F, Marre M: Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 12: 541-549, 2001.
317. Rudberg S, Rasmussen LM, Bangstad HJ, Osterby R: Influence of insertion/deletion polymorphism in the ACE-I gene on the progression of diabetic glomerulopathy in type 1 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 23: 544-548, 2000.
318. Wong TY, Poon P, Chow KM, Szeto CC, Cheung MK, Li PK: Association of transforming growth factor-beta T869C (Leu10Pro) gene polymorphisms with type 2 diabetic nephropathy in Chinese. *Kidney Int* 63: 1831-1835, 2003.

-
319. Mazouz H, Kacso I, Ghazali A, El Esper N, Moriniere P, Makdassi R, Hardy P, Westeel PF, Achard JM, Pruna A, Fournier A: Risk factors of renal failure progression two years prior to dialysis. *Clinical Nephrology* 51: 355-366, 1999.
320. Seikaly MG, Ho PL, Emmet L, Fine RN, Tejani A: Chronic renal insufficiency in children: The 2001 Annual Report of the NAPRTCS. *Pediatr Nephrol* 18: 796-804, 2003.
321. Kikunami K, Nishizawa Y, Tabata T, Nakatsuka K, Matsushita Y, Inoue T, Miki T, Morii H: Changes in parathyroid hormone in diabetic patients on long-term hemodialysis. *Nephron* 54: 318-321, 1990.
322. Avram MM: Lower parathyroid hormone and creatinine in diabetic uremia; in Berlyne, Avram, Parathyroid hormone in kidney failure. *Contrib.Nephrol.*,vol.20,pp.4-8 (Karger,basel,1980).
323. Gansevoort RT, de Zeeuw D, de Jong PE: Dissociation between the course of the hemodynamic and antiproteinuric effects of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 44: 579-584, 1993.
324. Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U: Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med* 330: 1041-1046, 1994.
325. Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ: Genetic-epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 61: 503-508, 1980.
326. Diamond JR: Analogous pathobiological mechanisms in glomerulosclerosis and atherosclerosis. *Kidney Int Suppl* 31: 34-39, 1991.
327. Ritz E, Koch M: Morbidity and mortality due to hypertension in patients with renal failure. *Am J Kidney Dis* 21: 113-118, 1993.
328. Shulman NB, Ford CE, Hall WD: Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. *Hypertension* 13: 80-93, 1989.
329. Ordoñez JD, Hiatt RA, Killebrew EJ; Fireman BH: The increased risk of coronary heart disease associated with the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 44: 638-642, 1993.

330. Kannel WB, Stampfer MJ, Castelli WP, Verter J: The prognostic significance of proteinuria: The Framingham study. *Am Heart J* 108: 1347-1352, 1984.
331. Van Bockxmeer FM, Mamotte CD: Apolipoprotein epsilon 4 homozygosity in young men with coronary heart disease. *Lancet* 340: 879-880, 1992.
332. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ: A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 334: 1090-1094, 1996.
333. Nikol S, Isner JM, Pickering JG, Kearney M, Leclerc G, Weir L: Expression of transforming growth factor- β 1 is increased in human vascular restenosis lesions. *J Clin Invest* 90: 1582-1592, 1992.
334. Grainger DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A: The serum concentration of active transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1: 74-79, 1995.
335. Wang XL, Liu SX, Wilcken DE: Circulating transforming growth factor- β 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 34: 404-410, 1997.