



Società Italiana dell'Ipertensione Arteriosa
Lega Italiana contro l'Ipertensione Arteriosa
Fondi di Supporto alla Ricerca anno 2011

PROGETTO DI RICERCA

**IPOVITAMINOSI D E DANNO D'ORGANO SUCLINICO E CLINICO IN
SOGGETTI CON IPERTENSIONE ARTERIOSA SISTO-DIASTOLICA:
EFFICACIA DELLA SUPPLEMENTAZIONE CON COLECALCIFEROLO SUL
CONTROLLO PRESSORIO E SULLA PROGRESSIONE DEL DANNO
D'ORGANO**

NOMINATIVO DEL RICERCATORE RESPONSABILE DEL PROGETTO

Dr. Lanfranco D'Elia

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Napoli
"Federico II", Napoli

LISTA DEI CO-AUTORI E DEI CENTRI PARTECIPANTI

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi
"Federico II", Napoli

- Dr. Domenico Rendina
- Prof. Giovanni de Simone
- Prof. Pasquale Strazzullo

Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso", Consiglio Nazionale
delle Ricerche, Napoli

- Dr. Teresa Esposito
- Dr. Fernando Gianfrancesco

Dipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino - Metaboliche e
Biochimica, Università degli Studi; Siena

- Dr. Luigi Gennari
- Prof. Renato Nami
- Prof. Ranuccio Nuti

U342 Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM),
Saint Vincent de Paul Hospital, René Descartes Université, Paris.

- Dr. Gianpaolo De Filippo

RAZIONALE E SCOPI DELLA RICERCA

Dati epidemiologici.

L'ipertensione arteriosa è il principale fattore di rischio modificabile per le patologie cardiovascolari ed è responsabile di oltre il 13,5% della mortalità mondiale annua e del 6% dei DALYs (indice che esprime la somma degli anni di vita persi per morte prematura e degli anni di vita produttiva persi per disabilità (http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/index.html); Lawes CCM et al. *Lancet* 2008; 371:1513-8). Nonostante il trattamento dell'ipertensione arteriosa abbia ridotto in maniera significativa la mortalità e morbilità per ictus, malattie coronariche e scompenso cardiaco, una frazione importante di pazienti in trattamento non presenta valori di pressione arteriosa ottimali (Yusuf S et al. *Circulation* 2001 104:2746-53; Collins R et al. *Lancet* 1990 335:827-38; Wolf-Maier K et al. *Hypertension* 2004 43:10-7). La morbilità e mortalità legate all'ipertensione sono sostanzialmente determinate dallo sviluppo di danno d'organo, cioè di una serie di alterazioni strutturali e funzionali a carico di cuore, vasi, sistema nervoso centrale e rene che condizionano in maniera determinante la prognosi del paziente iperteso (Stamler J et al. *Arch Intern Med* 1993; 153: 598-615; *The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J* 2007 28: 1462-536).

Il danno cardiovascolare in corso di ipertensione arteriosa: aspetti etiopatogenetici.

A livello cardiaco, in particolare, l'elevazione dei valori pressori sistemici determina uno stress meccanico diretto sul miocita ed un'attivazione neuro-ormonale, che si esprime con l'aumentata biosintesi e rilascio di catecolamine, angiotensina-II, peptidi natriuretici e citochine infiammatorie. L'interazione tra questi fattori meccanici e biumorali induce nel miocita specifiche alterazioni epigenetiche il cui risultato finale è un miocita ipertrofico ed iperplastico, che si contrae meno efficacemente ed esprime geni fisiologicamente espressi nel corso dello sviluppo fetale quali il fattore natriuretico atriale, la catena pesante della miosina beta, l'alfa actina muscolare scheletrica e l'ATPasi del reticolo sarcoplasmatico fetale (*Homcy CJ et al. Circulation 1998 97: 1890-2; Lifton RP et al. Cell. 2001 104:545-56; Molkentin JD et al. Annu Rev Physiol 2001 63: 391-426; Nadal-Ginard B et al. Circ Res 2003 92: 139-50*).

In corso di ipertensione arteriosa non controllata, l'aumento del carico di lavoro meccanico, le modificazioni epigenetiche e l'iperproduzione di citochine infiammatorie e peptidi natriuretici assumono un carattere di cronicità e possono determinare anche l'attivazione di processi biologici che conducono all'apoptosi cellulare (*Hamet P et al. Hypertension 1995 26:642-8; Condorelli G et al. Circulation 1999 99:3071-8; Cheng W et al. J Clin Invest 1995 96:2247-59*).

L'ipertrofia cardiaca che si manifesta in corso di ipertensione non è dunque un mero fenomeno di adattamento funzionale del muscolo cardiaco all'aumento dei livelli di pressione arteriosa e lo sviluppo della massa ventricolare sinistra nell'iperteso non è spiegabile solo in base al carico

emodinamico, in quanto spesso eccede i valori che sarebbero considerabili compensatori (*Mureddu GF et al. J Hypertens 2001 19:1113-9*). La comparsa di ipertrofia ventricolare sinistra, specie quando inappropriatamente alta in relazione al carico emodinamico sofferto, deve essere ricercata con attenzione nell'inquadramento clinico-diagnostico del paziente iperteso in quanto rappresenta un fattore in grado di influenzare significativamente la prognosi *quoad vitam et quoad validitatem* (*de Simone G et al. Hypertension 2002 40:470-6; de Simone G et al. Hypertension 2010 56:99-104*).

L'identificazione dei fattori che favoriscono lo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra in pazienti ipertesi e ne influenzano l'evoluzione verso lo scompenso cardiaco ha un estremo interesse anche sul piano terapeutico. In effetti un approccio terapeutico mirato alla riduzione del rischio cardiovascolare globale del singolo paziente iperteso deve necessariamente mirare all'identificazione del danno d'organo, preferibilmente quando non ancora clinicamente evidente (subclinico). A tale proposito, nell'inquadramento clinico proposto dalle linee-guida delle Società Europee di Cardiologia e di Ipertensione sono previsti esami biochimici e procedure strumentali finalizzate alla ricerca ed alla identificazione del danno d'organo precoce (*The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2007 28: 1462-536*).

Vitamina D e ipertensione arteriosa.

E' ormai noto che il deficit di vitamina D rappresenta un predittore del rischio di sviluppare un primo evento cardiovascolare (infarto del miocardio, insufficienza coronarica documentata elettrocardiograficamente, angina, stroke, attacco ischemico transitorio, scompenso cardiaco o claudicatio) nei pazienti ipertesi (*Wang TJ et al. Circulation 2008 117:503-11*). In particolare, è stato riportato che il rischio cumulativo di sviluppare un primo evento cardiovascolare in un intervallo medio di 5 anni per un paziente iperteso con livelli serici di 25OHD₃ <15 ng/ml è del 60% superiore a quello di un soggetto iperteso con livelli di 25OHD₃ ≥15 ng/ml (Hazard Ratio 1.62; 95% intervalli di confidenza 1.11-2.36). Questo maggior rischio rimane significativo anche dopo correzione per una serie di covariate a loro volta in grado di influenzare significativamente il rischio, cioè sesso, età, etnia, tabagismo, indice di massa corporea, livelli serici di creatinina e proteina C-reattiva, rapporto colesterolo totale/HDL colesterolo, presenza di diabete mellito, grado di attività fisica ed uso di integratori polivitaminici. Il maggior rischio di eventi cardiovascolari legato al deficit di vitamina D non si evidenzia però tra i soggetti normotesi (*Wang TJ et al. Circulation 2008 117:503-11*): sembra possibile quindi che il deficit di vitamina D e l'aumento della pressione arteriosa sisto-diastolica esercitino un effetto sinergico nel causare il danno d'organo a livello cardiaco e quindi nel determinare il rischio cardiovascolare globale del paziente iperteso. Questa ipotesi è tanto più meritevole di attenzione in ragione della elevata prevalenza non solo dell'ipertensione ma anche del deficit di vitamina D nella popolazione

generale in ogni classe di età (*Golden SH et al. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 1853-78; Reis JP et al. Pediatrics 2009 124:e371-9*).

Il sistema biologico vitamina D/VDR.

La vitamina D è un ormone lipofilo presente in natura in due isoforme: quella animale (vitamina D₃, colecalciferolo) e quella vegetale (vitamina D₂, ergosterolo). Il nostro organismo è in grado di sintetizzare la vitamina D sfruttando l'energia elettromagnetica della luce solare, per trasformare il 7-deidrocolesterolo in colecalciferolo. Questo pro-ormone prodotto a livello cutaneo, insieme a quello assunto con la dieta (20% del totale), subisce due idrossilazioni, una epatica in posizione 25 e l'altra renale in posizione 1, quest'ultima reazione mediata dalla 1 α -idrossilasi. Il prodotto finale del processo di idrossilazione, l'1,25(OH)₂D₃, è la forma biologicamente attiva dell'ormone (*Heaney RP J Bone Miner Res 2007 22: V25-7*).

L'1,25(OH)₂D₃ ha due differenti modalità d'azione entrambe mediate dal suo specifico recettore (VDR - vitamin D receptor): una genomica di lungo periodo, legata alla proprietà del sistema biologico 1,25(OH)₂D₃-VDR di regolare la trascrizione di oltre il 3% del genoma umano, inclusi molti geni implicati nei processi di regolazione dell'apoptosi cellulare, ed una non-genomica a breve termine (*Erben RG et al. Mol Endocrinol 2002; 16: 1524-37; Dusso AS et al. Am J Physiol Renal Physiol 2005 289: F8-28*).

Le attività biologiche endocrine e paracrine dell'1,25(OH)₂D₃ sono sistemiche e pleomorfe: oltre alla capacità di regolazione del metabolismo calcio-fosforico e dell'omeostasi scheletrica, il sistema biologico vitamina D-

VDR è in grado di regolare i processi di proliferazione e differenziazione di differenti tipologie di cellule. In particolare, diversi studi epidemiologici e sperimentali hanno dimostrato la capacità del sistema biologico vitamina D-VDR di prevenire l'insorgenza di malattie croniche e/o multifattoriali e di modulare le funzioni del sistema immune e di altri sistemi endocrini, *in primis* il sistema renina-angiotensina e il sistema insulina-glucagone (*Norman AW Am J Clin Nutr 2008 88:491S-9S; Haussler MR et al. Nutr Rev 2008 66: S98-112; DeLuca HF Am J Clin Nutr 2004; 80: 1689S- 96S*).

Omeostasi della vitamina D.

I livelli serici di 25OHD₃ sono considerati un indice attendibile delle riserve funzionali di vitamina D (*Holick MF N Engl J Med 2007 357: 266-81*). Sebbene non esistano al momento criteri accettati universalmente, la maggioranza degli esperti concorda nell'identificare una condizione di sufficienti riserve funzionali di vitamina D il riscontro di livelli serici di 25OHD₃ uguali o superiori a 30 ng/ml. Livelli circolanti di 25OHD₃ compresi tra 20 e 30 ng/ml identificano una condizione di insufficienti riserve funzionali di vitamina D mentre livelli circolanti di 25OHD₃ inferiori a 20 ng/ml identificano una condizione di severo deficit di vitamina D (*Holick MF. N Engl J Med 2007 357: 266-81*). Secondo recenti stime, una condizione di severa ipovitaminosi D si osserva in circa il 50% della popolazione mondiale, con una prevalenza crescente all'aumentare dell'età (*Holick MF. Mayo Clin Proc 2006 81:353-73*). È necessario tuttavia rilevare che anche in età pediatrica è stata descritta una significativa prevalenza di ipovitaminosi D in soggetti obesi in epoca prepubere

e pubere. Questi stessi soggetti sono anche ad aumentato rischio di ipertensione arteriosa (Reis JP et al. *Pediatrics* 2009 124:e371-9; Viggiano D et al. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009 49:329-34).

Vitamina D e ipertensione arteriosa: aspetti fisio-patogenetici.

Una recente metanalisi, basata prevalentemente su studi caso-controllo e su dati derivati dalla misurazione convenzionale della pressione arteriosa nello studio del medico o a domicilio del paziente, ha indicato l'esistenza di una relazione inversa tra livelli serici di 25OHD₃ e prevalenza di ipertensione arteriosa (Burgaz A et al. *J Hypertens*, 2010 Dec 28).

I possibili legami fisio-patogenetici esistenti tra il sistema biologico della vitamina D ed i meccanismi di regolazione della pressione arteriosa sono graficamente riportati in Figura 1 (modificata da Pilz S et al. *Nat Rev Cardiol* 2009 6: 621–30).

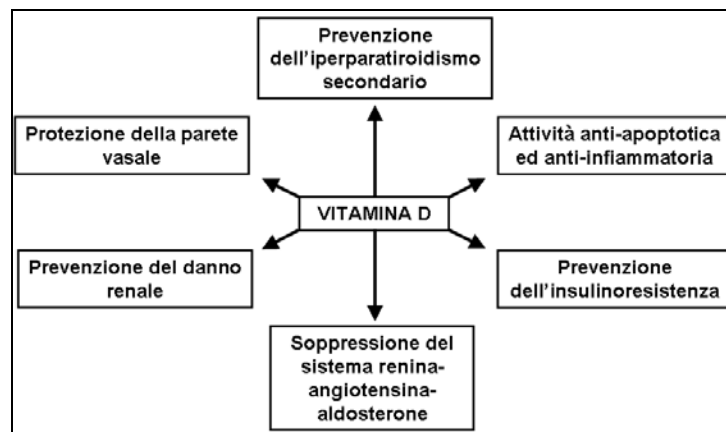


Figura 1. Possibili legami fisio-patogenetici esistenti il sistema biologico della vitamina D ed i meccanismi di regolazione della pressione arteriosa

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone è il principale regolatore della volemia e dell'omeostasi idroelettrolitica. L'attivazione di questo sistema è patogeneticamente collegato allo sviluppo di ipertensione (*Connell JM et al. Endocr Rev 2008 29:133-54*). Il sistema vitamina D/VDR è in grado di regolare la trascrizione del gene della renina, agendo sul fattore di trascrizione CREB (cAMP response element-binding protein) (*Li YC et al. J Clin Invest 2002 110: 229-38; Yuan W et al. J Biol Chem 2007 282:29821-30*). A conferma di ciò, è stata rilevata una relazione inversa tra livelli di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ed attività reninica plasmatica in pazienti con ipertensione arteriosa essenziale (*Burgess ED. Am J Hypertens 1990 3: 903-5*).

Diversi studi osservazionali permettono inoltre di affermare che esiste un legame patogenetico diretto tra paratormone e meccanismi di regolazione della pressione arteriosa. In particolare, la condizione clinica di iperparatiroidismo secondario ad un deficit significativo di vitamina D predispone allo sviluppo di ipertensione arteriosa, verosimilmente attraverso un effetto diretto (e/o mediato dalla ridotta disponibilità di ioni calcio) del paratormone sulle cellule della muscolatura liscia vasale (*Fitzpatrick L et al. Curr Osteoporos Rep 2008 6: 77-83; Snijder MB et al. J Intern Med 2007 261: 558-65; Hulter HN et al. J Clin Hypertens 1986 2: 360-70*).

Evidenze sperimentali hanno inoltre confermato che le cellule endoteliali, i macrofagi e le stesse fibrocellule muscolari lisce della parte vasale esprimono sia il VDR sia l' 1α -idrossilasi: esse, quindi, non solo sono responsive alle azioni biologiche dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ma sembrano anche in grado di sintetizzarla *in loco*

(Peterlik M et al. *Eur J Clin Invest* 2005 35, 290-304; Bouillon R et al. *Endocr Rev* 2008 29: 726-76).

In modelli sperimentali, l'1,25(OH)₂D₃ regola direttamente la contrattilità arteriosa endotelio-dipendente (Wong MS et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 295: H289-96). In particolare, sono riportati possibili effetti vaso-protettivi dell'1,25(OH)₂D₃ legati alla sua capacità di regolare la funzione dell'ossido nitrico sintetasi, alle sue proprietà anti-infiammatorie ed anti-apoptiche (Talmor Y et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 294: F1059-64; Talmor Y et al. *Eur J Clin Invest* 2008 38: 548-54; Gysemans CA et al. *Endocrinology* 2005 146: 1956-64), alla sua influenza sulla sensibilità delle cellule muscolari lisce della parete vasale agli stimoli vasocostrittivi (van Etten E et al. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005 97: 93-101) e alla capacità del sistema vitamina D/VDR di regolare la proliferazione delle cellule mesangiali (Kuhlmann A et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004 286: F526-33; Hariharan S et al. *J Lab Clin Med* 1991 117: 423-9).

Del sistema vitamina D/VDR è stata riportata anche la capacità biologica di influenzare la biosintesi e il rilascio di insulina da parte delle cellule insulari pancreatiche nonché la sensibilità dei tessuti periferici all'insulina, svolgendo un'azione protettiva nei confronti del fenomeno biologico dell'insulino-resistenza (Maestro B et al. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003 84: 223-30; Maestro B et al. *Cell Biochem Funct* 2002 20: 227-32; Maestro B et al. *Endocr J* 2000 47: 383-91; Bischoff HA *Histochem J* 2001 33: 19-24; Wollheim CB et al. *Physiol Rev* 1981 61: 914-73; Wright DC et al. *Diabetes* 2004 53:330-5; Rabinovitch A et al. *Endocrinology* 2001 142: 3649-55).

Infine, va sottolineata la dimostrata capacità del sistema biologico vitamina D/VDR di regolare l'espressione genica dei peptidi natriuretici, che non sono semplicemente dei marcatori di ipertrofia cardiaca ma anche fattori autocrino-paracrini in grado regolare lo sviluppo della massa cardiaca in risposta a stimoli fisiologici e non (*Chen S et al. Hypertension 1998 31: 1338-42; Li Q et al. J Biol Chem 1994 269: 4934-9; Chen S et al. Regul Pept 2005; 128: 197-202*). Essi esercitano infatti una azione anti-ipertrofica ed anti-fibrotica diretta tale da determinare, in caso di loro assenza o di significativa riduzione, una marcata ipertrofia soprattutto in corso di ipertensione arteriosa (*Rubattu S et al. J Am Coll Cardiol 2006 48:499-505; Oliver PM et al. Proc Natl Acad Sci USA 1997 94:14730-5*). I livelli circolanti di peptidi natriuretici atriali hanno rivelato un forte potere predittivo di futuri eventi cardiovascolari in corso di scompenso cardiaco e di cardiopatia ischemica (*Masson S et al. Eur J Heart Fail 2010 12:338-47; Khan SQ et al. J Am Coll Cardiol 2008 51:1857-64*)

Un'intrigante ipotesi di lavoro è quindi che una condizione di deficit di vitamina D influenzi in maniera significativa i meccanismi molecolari che, a livello biochimico e genetico, determinano lo sviluppo del danno d'organo secondario alla malattia ipertensiva a livello cardiaco e ne condizioni in maniera significativa l'espressione clinica. I dati precedentemente riportati circa l'aumentata incidenza di un primo evento cardiovascolare in pazienti ipertesi con deficit di vitamina D sono in accordo con questa ipotesi di lavoro. D'altra parte un'analisi critica della letteratura internazionale evidenzia l'assoluta mancanza di studi clinici controllati che abbiano valutato gli effetti della supplementazione di vitamina D sul danno cardiovascolare in pazienti ipertesi

con carenza accertata dell'ormone (*Burgaz A et al. J Hypertens, 2010 Dec 28; Pilz S et al. Nat Rev Cardiol 2009 6: 621–30*).

DISEGNO E CRONO-PROGRAMMA DI ESECUZIONE DEL PROGETTO

L'obiettivo principale del presente progetto di ricerca è dunque quello di valutare l'efficacia della supplementazione con colecalciferolo sul controllo pressorio e sulla progressione del danno d'organo subclinico e clinico in pazienti ipertesi con documentato deficit di vitamina D. Tale obiettivo sarà raggiunto attraverso uno studio clinico controllato, utilizzando un disegno già sperimentato con successo in studi precedenti (*Siani A et al. Ann Intern Med 1991 115: 753-9; Ferrara LA et al. Arch Intern Med 2000, 160:837-42*).

La popolazione arruolata per lo studio prospettico sarà costituita da pazienti ipertesi di entrambi i sessi in trattamento farmacologico che presentino a) valori di pressione arteriosa sisto-diastolica $\leq 140/90$ mmHg in due controlli successivi a distanza di almeno 2 settimane; b) livelli serici di 25OHD₃ <20 ng/ml. I pazienti verranno divisi in maniera casuale, attraverso un elenco generato elettronicamente, in due gruppi.

Al primo gruppo sarà prescritta per 12 mesi una dieta iposodica, normocalorica e normocalcica (2000 ckal/die; carboidrati: 52%, lipidi: 29%, proteine: 19%, calcio: 1 gr, fosfati: 0,9 gr, sodio: 100 mEq, colesterolo: 200 mg, rapporto acidi grassi polinsaturi/saturi: 0.88) e ed una supplementazione con colecalciferolo in accordo con i criteri previsitati da Holick (*Holick MF N Engl J Med 2007 357: 266-81*).

Al secondo gruppo sarà prescritta per 12 mesi la stessa dieta iposodica, normocalorica e normocalcica e una supplementazione con un placebo avente le stesse caratteristiche organolettiche del colecalciferolo.

A entrambi i gruppi sarà prescritta la stessa terapia farmacologica in atto al momento dell'arruolamento e dimostratasi in grado di realizzare un soddisfacente controllo pressorio.

Dall'inizio del progetto e per i 12 mesi successivi, i pazienti dei due gruppi saranno periodicamente rivalutati secondo il programma sottostante:

	I^a visita	Visita ogni mese	Visita ogni 2 mesi	Visita a 6 mesi	Visita a 12 mesi
Raccolta dati anamnestici e consenso informato	X				
Anamnesi farmacologica	X	X	X	X	X
Valutazione del controllo pressorio ed eventuale adeguamento terapia	X	X	X	X	X
Parametri biochimici	X			X	X
Monitoraggio pressorio 24 h	X		X	X	X
Elettrocardiogramma a 12 derivazioni	X		X	X	X
Ecocolordoppler cardiaco	X			X	X
Ecocolordoppler dei tronchi sovra-aortici	X				X
Stima della rigidità arteriosa (stiffness)	X			X	X

L'aderenza alla dieta iposodica prescritta sarà valutata in base alle variazioni dell'escrezione urinaria di sodio nelle 24 ore (*Rendina D et al. Nephrol Dial Transplant in press*).

In occasione dei controlli mensili della pressione arteriosa, qualora i valori pressori si siano mantenuti < 130/85 mmHg, la posologia dei farmaci assunti dal paziente all'atto del reclutamento sarà ridotta secondo una procedura "a scalini" (1/2 del dosaggio base del farmaco) e, in caso di terapia di associazione, secondo una sequenza fissa nel seguente ordine: diuretico, Ca-antagonista o altro eventuale vasodilatatore, inibitore del sistema renina-angiotensina, beta-bloccante. Eventuali difformità di azione rispetto a questa sequenza predeterminata potranno realizzarsi eccezionalmente in relazione a specifiche caratteristiche cliniche del paziente, a giudizio del medico. In caso di pressione arteriosa > 140/90 mmHg in occasione di due successive visite mensili (o anche di una singola visita se la pressione arteriosa riscontrata sia > 160/95 mmHg) la posologia sarà invece aumentata o un nuovo farmaco sarà aggiunto alla terapia secondo una sequenza inversa a quella sopra riportata. La prescrizione del trattamento sarà sempre eseguita da un medico non a conoscenza del gruppo cui il paziente è assegnato.

L'endpoint primario dello studio è un endpoint composito costituito dalla somma dei seguenti endpoint secondari: a) valutazione comparativa nei due gruppi del consumo di farmaci necessario per il mantenimento del controllo pressorio al termine dello studio; b) valutazione comparativa delle eventuali variazioni degli indici biochimici e strumentali di danno d'organo clinico e subclinico nel corso dello studio.

Si prevede di reclutare un'adeguata numerosità campionaria di pazienti ipertesi in un intervallo temporale di circa 12 mesi. Contemporaneamente al reclutamento dei pazienti si valuteranno i parametri biochimici e strumentali

oggetto di studio, si programmerà ed effettuerà la fase prospettica del progetto e si creeranno i database elettronici. L'estrazione del DNA dai linfociti periferici ed le successive indagini di biologia molecolare saranno effettuate complessivamente in un arco temporale di 12 mesi. Per ottimizzare tempi e ridurre i costi delle indagini di biologia molecolare si prevede di raggruppare i campioni ed identificare nei 24 mesi di durata complessiva del progetto 6 "finestre temporali" in cui eseguirle. Si prevede di analizzare i dati e divulgare i risultati preliminari entro 24 mesi. A seguire una scheda temporale del progetto.

	Mesi				
	0	6	12	18	24
Arruolamento pazienti	—————				
Creazione data-base elettronici	—————				
Estrazione DNA		———	———	———	
Analisi genetica			———	———	———
Analisi e comunicazione dei risultati					———

METODICHE

Raccolta dati anamnestici.

All'atto della prima visita, le finalità del progetto di ricerca verranno spiegate a tutti i partecipanti. Il medico esaminatore proporrà quindi al probando uno specifico questionario a risposte chiuse (multiple) o aperte, già validato in precedenti studi (<http://www.olivettiheartstudy.org/designrationaleandobjectives.asp>), finalizzato alla raccolta dei dati relativi alla prevalenza di patologie cardiovascolari nel probando e nei suoi parenti di primo grado, alla determinazione dell'introito alimentare di sale, calcio e degli altri principali principi alimentari ed alla

quantificazione dell'attività fisica giornaliera svolta e dell'eventuale consumo di alcool e tabacco. Il probando sarà sottoposto a una visita medica con valutazione dei principali indici biometrici.

Misurazione pressione arteriosa.

La misurazione della pressione arteriosa sarà effettuata secondo la metodica convenzionale e con l'utilizzo di uno sfigmomanometro elettronico automatico in accordo con le linee-guida sulla misurazione convenzionale ed automatica della pressione arteriosa nello studio medico, a domicilio e nelle 24 ore edite dalla Società Italiana dell'Ipertensione Arteriosa (<http://www.sii.it/it/sii-guidelines/sii-articles/0/detail/0/155/208/linee-guida-della-societa-italiana-dellipertension.html>): la misurazione della pressione arteriosa verrà effettuata dopo che il paziente avrà osservato un periodo di riposo di almeno 5 minuti in un ambiente tranquillo a temperatura confortevole. Saranno eseguite tre misurazioni della pressione arteriosa a distanza di 1 minuto una d'altra: i valori della pressione arteriosa sistolica e diastolica saranno ottenuti dalla media delle ultime due misurazioni. Per la misurazione sarà utilizzato l'arto non dominante dopo aver verificato l'insussistenza di significative differenze tra i due arti. La manutenzione e calibrazione degli strumenti di misurazione manuali ed automatici della pressione arteriosa sarà praticata in accordo con i criteri previsti nelle linee guida precedentemente citate (<http://www.sii.it/it/sii-guidelines/sii-articles/0/detail/0/155/208/linee-guida-della-societa-italiana-dellipertension.html>). Sono previsti controlli crociati

degli apparecchi utilizzati dai diversi Centri coinvolti nel protocollo di studio con scadenza trimestrale.

Criteri per la determinazione dei parametri biochimici e genetici.

Nella giornata precedente alla prima visita, tutti i pazienti saranno invitati a praticare una raccolta delle urine delle 24 ore. L'intera raccolta verrà consegnata all'esaminatore che ne determinerà il volume. Su campioni delle urine raccolte saranno determinati i seguenti parametri: cortisolo, proteine totali, microalbumina, calcio, magnesio, fosfati, sodio, potassio, cloro ed acido urico. Su un campione urinario raccolto la mattina, a fresco, a digiuno, circa tre ore dopo il primo mitto, verrà determinato il pH tramite pHmetro.

Su un campione di sangue venoso raccolto la mattina della visita a digiuno è prevista la determinazione dei seguenti parametri biochimici: proteina C-reattiva, esame emocromocitometrico con formula leucocitaria e piastrinocrito, glicemia, insulinemia, colesterolo totale, HDL-colesterolo, LDL-colesterolo, trigliceridi, creatinina, calcio ionizzato, calcio totale, magnesio, fosfati, cloro, sodio, potassio, paratormone (molecola intatta), 25-idrossicolecalciferolo, TSH, pro-peptide natriuretico atriale e cerebrale.

La determinazione dei parametri biochimici non previsti nei protocolli diagnostici consigliati per l'inquadramento dei pazienti con ipertensione arteriosa, in particolare la misurazione dei livelli circolanti di 25-idrossicolecalciferolo e pro-peptide natriuretico atriale tipo A e B, sarà effettuata in maniera centralizzata su aliquote di siero e plasma congelate secondo i criteri

descritti in seguito. Per tutti gli altri parametri sono previsti controlli di qualità crociata tra i Centri partecipanti.

Sul DNA estratto dai leucociti periferici e stoccato secondo i criteri esposti successivamente, si procederà all'analisi di due polimorfismi del gene VDR (uno nella regione C-terminale ed uno nella regione N-terminale) in accordo con i criteri proposti da Whitfield e collaboratori (*Whitfield GK et al. Mol Cell Endocrinol 2001 177:145-59*). Le analisi genetiche saranno effettuate in maniera centralizzata presso l'Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati-Traverso" del Centro Nazionale delle Ricerche di Napoli in accordo con il crono programma del progetto esposto precedentemente.

Trattamento dei campioni biologici.

Il prelievo ematico sarà stoccato in quattro provette BD Vacutainer con 0,129M di 9NC (tappo azzurro), quattro provette BD Vacutainer con SST (tappo giallo) e due provette BD Vacutainer con 0,072 ml di K3E 7,5% (tappo viola). Dal sangue contenuto in due provette tappo azzurro, si procederà all'estrazione del DNA secondo la procedura salting out; descritta da Miller e collaboratori (*Miller SA et al. Nucl Acids Res 1988 16: 1215*). Il DNA estratto sarà stoccato in due aliquote, una per l'utilizzo immediato da conservare a 5 C° ed una da congelare a -70 C°, per evitare rotture della doppia elica.

I restanti campioni saranno centrifugati immediatamente e raccolti in aliquote di 0,5 ml in provette crio-resistenti con chiusura a vite e congelati a temperatura di -20 C°.

Dalla raccolta urinaria delle 24 h, trattata secondo i criteri di Tiselius e colleghi (*Tiselius HG et al. Eur Urol 2001 40: 362-471*), saranno stoccate aliquote di 20 ml raccolte in provette crioeresitenti con chiusura a vite che verranno congelate alla temperatura di -20 C°.

I criteri adottati per l'identificazione dei campioni biologici sono riportati successivamente

Indagini strumentali.

In accordo con le linee-guida delle Società Europee di Cardiologia e di Iperensione (*The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).Eur Heart J 2007 28: 1462-536*), nel processo di inquadramento clinico dei pazienti con ipertensione arteriosa è prevista l'esecuzione dei seguenti esami strumentali:

Monitoraggio della pressione arteriosa nelle 24 h con metodo oscillometrico. Saranno considerati validi per l'analisi statistica dei dati monitoraggi della durata di almeno 24 h, con almeno il 70% delle misurazioni valide, almeno 1 determinazione per ogni ora del periodo notturno ed almeno 2 determinazioni per ogni ora del periodo diurno. Si impiegheranno strumenti validati da protocolli internazionali standardizzati, programmati per effettuare almeno 1 misurazione della pressione arteriosa nel corso di un intervallo temporale non superiore ai 30 minuti. (<http://www.siiia.it/it/siia-guidelines/siia-articles/0/detail/0/155/208/linee-guida-della-societa-italiana-dellipertension.html>)

Elettrocardiogramma a 12 derivazioni. L'interpretazione dell'esame elettrocardiografico avverrà secondo i criteri proposti da Meek e colleghi (*Meek S et al. BMJ 2002 324:415-8; Meek S et al. BMJ 2002 324:470-3*) e da Edhouse e colleghi (*Edhouse J et al. BMJ. 2002 25;324:1264-7*). Particolare attenzione verrà posta al calcolo degli indici di Sokolow-Lyons ($SV1+RV5-6 >38$ mm) e di Cornell modificato (>2440 mm*ms) che sono in grado di predire futuri eventi cardiovascolari in pazienti ipertesi (*Levy D et al. Circulation 1994; 90: 1786-93*).

Ecocolordoppler cardiaco. La valutazione ecocardiografica di minima verrà effettuata secondo il protocollo standardizzato del Laboratorio di Ecocardiografia del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale del Policlinico Universitario di Napoli "Federico II" (*de Simone G et al. Manuale informativo sulle procedure di esecuzione e lettura off-line di esami Doppler-ecocardiografici transtoracici standard. DMCS Università Federico II, Napoli*), che prevede l'acquisizione delle immagini su supporto digitale standard (DICOM), secondo una procedura proprietaria, utilizzata in studi multicentrici, e la successiva lettura off-line su work-station (MediMatic, Genova). La valutazione ecocardiografica riguarderà tutti i parametri acquisibili di geometria e funzione ventricolare sinistra sia sistolica sia diastolica (incluse procedure Tissue-Doppler dell'anulus mitralico), ma sarà focalizzata sui seguenti parametri 1) massa ventricolare sinistra: valori di massa ventricolare sinistra, indicizzata per altezza^{2.7}, ≥ 49.2 g/m^{2.7} per il sesso maschile e ≥ 46.7 g/m^{2.7} per quello femminile saranno considerati indicativi di ipertrofia ventricolare sinistra; 2) rapporto tra spessore della parete e raggio della cavità: valori ≥ 0.42 saranno indicativi di geometria concentrica; 3) eccesso di massa ventricolare sinistra

relativamente al carico emodinamico ed alla taglia corporea: tale parametro sarà calcolato utilizzando il lavoro sistolico come indicatore del carico emodinamico globale, secondo quanto riportato in precedenza e validato prognosticamente in popolazioni differenti. I valori di eccesso di massa ventricolare sinistra > 121% del valore predetto saranno considerati indicativi di massa ventricolare sinistra inappropriata. (Celentano A et al. *Am J Cardiol* 2001 87:361-3; Chinali M et al. *J Hypertens* 2007 25:1073-8; Cioffi G et al. *Heart* 2011 97:301-7; de Simone G et al. *Hypertension* 2002 40:470-6; de Simone G et al. *Am J Hypertens* 2004 17:828-33; Mureddu GF et al. *J Hypertens* 2001 19:1113-9; Mureddu GF et al. *J Hypertens* 2009 27:642-9; Olsen MH et al. *J Hum Hypertens* 2004 18:437-43; de Simone G et al. *J Hypertens* 2001; 19:119-25) Saranno anche valutati diversi parametri di funzione sistolica e diastolica e di performance ventricolare (Devereux RB et al. *Am J Cardiol* 1986 57: 450-8; Lang RM et al. *Eur J Echocardiogr* 2006 7: 79-108; Muiesan ML et al. *Hypertension* 2004 43: 731-8; de Simone G et al. *Circulation* 1996 93: 259-65; Aurigemma GP et al. *J Am Coll Cardiol* 2001 37: 1042-8; Swedberg K et al. *Eur Heart J* 2005 26: 1115-40. Ogunyankin KO et al. *Echocardiography* 2006 23: 817-28; Bursi F et al. *JAMA* 2006; 296:2209-16; Baicu CF et al. *Circulation* 2005; 111:2306-12; de Simone G et al. *J Hypertens* 2009; 27:650-5)

Ecocolordoppler dei tronchi sovra-aortici. La valutazione ultrasonografica delle arterie carotidi sarà integrata dalla misurazione dello spessore del complesso intima-media e dalla ricerca di placche ateromasiche. Sebbene la relazione tra spessore intima-media carotidea e rischio cardiovascolare sia continua, esiste un valore soglia pari a 0.9 mm che

identifica una condizione di patologico spessore della parete carotidea.
(O'Leary DH et al. *N Engl J Med* 1999 340: 14-22)

Stima della rigidità arteriosa (stiffness). I parametri pressori centrali e la misura della rigidità arteriosa saranno ottenuti mediante la tecnica della tonometria per applanazione. Tutte le misurazioni saranno effettuate con lo SphygmoCor (AtCor Medical, Sydney, Australia, versione 8.0), in accordo con le linee guida internazionali (Laurent S et al., *Eur Heart J* 2006;27:2588-605). Per la stima dei valori emodinamici centrali sarà utilizzato un trasduttore di pressione ad alta precisione per registrare in maniera non invasiva l'onda pressoria a livello dell'arteria radiale. Il sistema consentirà di derivare la forma d'onda a livello dell'aorta ascendente attraverso un algoritmo matematico, da cui ricavare i seguenti parametri: Pressione sistolica centrale (PASC), Pressione Pulsatoria centrale (PPc), Augmentation Pressure (AP) e Augmentation Index (AIx).

Inoltre, sarà valutata la velocità dell'onda di polso aortica (aPWV) tra il sito carotideo e femorale, considerata il "gold-standard" per la stima della rigidità arteriosa. (*The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC).* *Eur Heart J* 2007 28: 1462-536) Per quanto concerne la aPWV, il sistema utilizzerà la tonometria per applanazione unitamente all'elettrocardiogramma a tre derivazioni per effettuare misurazioni sequenziali nei due siti arteriosi. I tempi di inizio della sistole delle onde pressorie sono confrontati con i tempi delle onde R corrispondenti sul tracciato ECG, e il software calcola la latenza temporale. La aPWV è calcolata come rapporto tra

la distanza e la latenza temporale tra le onde di polso ed è espressa in metri al secondo (m/sec).

Considerazioni etiche.

In accordo con i criteri stabiliti nella Convenzione di Oviedo (<http://www.portaledibioetica.it/documenti/001306/001306.htm>) e nella Dichiarazione di Helsinki per la protezione dei diritti dell'uomo e la dignità dell'essere umano nei confronti della biologia e della medicina (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) si prevede all'atto della visita la richiesta di consenso informato al prelievo di materiale biologico ed al suo successivo utilizzo a scopi diagnostici e di ricerca, senza fini di lucro. Nel modello di richiesta di consenso informato è inoltre esplicitamente prevista la possibilità del ritiro del consenso dato, in ogni momento.

Per l'identificazione dei campioni biologici, si prevede l'utilizzo di un sistema alfanumerico a codifica unica, con archiviazione cartacea ed elettronica dei dati. Per garantire l'anonimato della biobanca si prevede l'utilizzo di due database diversi, uno codificato per inserire i dati relativi ai materiali biologici ed uno per conservare i dati personali del donatore. La copia elettronica di tale database sarà protetta da una password e non consultabile dall'esterno, mentre la copia cartacea sarà tenuta sottochiave. Il responsabile scientifico del progetto di ricerca si rende garante della corretta custodia degli archivi cartacei ed elettronici. Le modalità di raccolta, conservazione ed eventuale distruzione dei campioni biologici, così come le modalità di codifica, raccolta ed utilizzo dei dati saranno chiaramente dichiarati nel modulo di consenso informato, in accordo

con i criteri S.I.G.U. per la creazione e gestione delle biobanche (http://www.sigu.net/index.php?option=com_docman&Itemid=91&limitstart=10).

Non sono previste nel progetto né la somministrazione di farmaci non approvati dalla letteratura medica internazionale né l'esecuzione di procedure diagnostiche invasive.

In accordo con i criteri proposti nella dichiarazione di Ottawa (*Krleza-Jeric K et al. BMJ 2005 330:956-9*) al momento o prima dell'arruolamento dei pazienti è prevista la registrazione del protocollo di ricerca presso il registro dell'Osservatorio Nazionale degli Studi Clinici (OsSC) previa richiesta di approvazione del Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Criteri di esclusione.

Forme secondarie di ipertensione arteriosa (*The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2007 28: 1462-536*); anamnesi personale e familiare positiva per rachitismo e/o osteomalacia; alterazioni della funzionalità paratiroidea: iperparatiroidismo primitivo o secondario, ipoparatiroidismo primitivo o secondario (*Marx SJ N Engl J Med 2000 343:1863-75*); acidosi tubulare renale: pH urinario >7, ipopotassiemia e urinary net charge positivo (*Smulders YM et al. Arch Intern Med 1996 156: 1629-36*); alterazioni della funzionalità tiroidea: livelli serici di TSH <0.5 mUI/ml o >4.5 mUI/ml (*Biondi B et al. Endocr Rev 2008 29: 76-131*);

stati di diarrea cronica; anamnesi farmacologia positiva per l'assunzione di farmaci antiriassorbitivi e/o vitamina D.

METODI DI VALUTAZIONE STATISTICA DEI DATI

Per la stima della numerosità campionaria è stato utilizzato il programma di calcolo Sample Size Calculator[®] (<http://www.epicentro.iss.it/stumenti/SampleSize.asp>).

La numerosità campionaria per ciascun gruppo è stata fissata in 60 pazienti (al lordo di un drop-out nel corso dello studio del 15%) ipotizzando una differenza nel consumo di farmaci pari al 20% tra i due gruppi a parità di controllo pressorio, della massa ventricolare sinistra di $10 \text{ g/m}^{2.7}$ (DS=20) e di aPWV di 1.3 m/s (DS=2.2) al termine dello studio, con un errore alfa del 5% ed un errore beta del 20%.

Per l'analisi statistica si utilizzerà il programma di calcolo SPSS[®] (Statistical Package for Social Science) versione 12.0. Per le differenti tipologie di analisi statistica, è stato stabilito come limite di significatività un valore di p inferiore a 0.05.

Le procedure utilizzate per la verifica delle ipotesi di lavoro saranno adeguate alla tipologia di esperimento (*Glantz SA, 2003*).

Nelle procedure di analisi univariata delle variabili quantitative (intervallari) saranno utilizzati il *t*-test per variabili indipendenti e l'analisi della varianza con correzione di Bonferroni per valutare la significatività statistica

della differenza riscontrata tra i due gruppi. Nelle procedure di analisi univariata delle variabili qualitative (nominali) saranno utilizzati le tabelle di contingenza con test χ^2 . In particolare, il consumo di farmaci al termine dello studio e la variazione del consumo tra l'inizio e la fine dello studio nei due gruppi a confronto saranno valutati mediante il Mann-Whitney *U* test. Il confronto tra le percentuali di pazienti che avranno eventualmente mantenuto valori pressori < 140/90 mmHg avendo sospeso del tutto l'assunzione di farmaci sarà realizzato mediante χ^2 test for 2 x 2 contingency table.

Successivi modelli di regressione logistica binaria saranno costruiti in base ai risultati delle procedure di analisi univariata per valutare eventuali fenomeni di interferenza statistica tra le variabili esaminate. Tali modelli saranno adattati alla procedura di regressione logistica oppure a quella di regressione logistica multinomiale in relazione alla tipologia di variabili da esaminare (intervallari o nominali).

Per l'analisi statistica della varianza quando su ciascun soggetto è stata effettuata più di una misurazione in tempi differenti saranno utilizzati a) il *t*-test per variabili appaiate (variabili intervallari) ed il test di McNemar (variabili nominali) in caso di due misure; b) l'analisi della varianza per misure ripetute (variabili intervallari) ed il test Q di Cochran (variabili nominali) in caso di tre o più misure.

Per valutare la forza dell'associazione tra due variabili saranno utilizzate la regressione lineare e correlazione di Pearson (variabili intervallari) e la stima del rischio relativo o odds ratio (variabili nominali).

Per correttamente analizzare la distribuzione dei dati genetici ottenuti nella popolazioni con differenti caratteristiche fenotipiche si prevede il calcolo della frequenza delle varianti alleliche e dei genotipi (inclusa la loro aderenza all'equilibrio di Hardy-Weinberg) e la successiva analisi dei dati secondo modelli genetici di tipo recessivo e dominante (incluso il calcolo degli odds ratios) utilizzando il programma di calcolo FINETTI (<http://ihg.ghs.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). (*Elston RC et al. Biometrics 1977 33: 536-542*)

RISULTATI ATTESI /EVENTUALI RISULTATI GIÀ OTTENUTI

Una revisione critica dei dati presenti al momento in letteratura internazionale sul rapporto patogenetico esistente tra ormoni calciotropi e meccanismi di regolazione della pressione arteriosa evidenzia che: a) la maggior parte dei dati presenti in letteratura è basata su studi trasversali di tipo osservazionale; b) non sono presenti studi clinici che valutino nel complesso l'interazione tra i vari elementi del sistema biologico vitamina D/VDR/PTH ed i meccanismi di regolazione della pressione arteriosa; c) non sono presenti studi clinici che valutino nel complesso l'interazione tra i vari elementi del sistema biologico vitamina D/VDR/PTH ed il danno d'organo subclinico e clinico in corso di ipertensione; d) non sono presenti studi clinici prospettici che valutino l'effetto della supplementazione con vitamina D sul compenso dei valori pressori e sull'espressione clinica del danno d'organo nei soggetti ipertesi con ipovitaminosi conclamata (*Burgaz A et al. J Hypertens 2010 Dec 28; Pilz S et al. Nat Rev Cardiol 2009 6: 621–30*).

I risultati attesi dal presente progetto di ricerca consentiranno di chiarire alcuni di questi aspetti, in particolare quelli riguardanti la risposta terapeutica alla supplementazione con vitamina D nei soggetti ipertesi con ipovitaminosi conclamata, fornendo quindi nuovi bersagli per interventi farmacologici mirati in corso di ipertensione arteriosa.

L'analisi dei dati genetici fornirà inoltre nuove informazioni sui fattori che regolano l'interazione geni-ambiente nel determinare lo sviluppo della cardiopatia ipertensiva. Saranno possibili valutazioni farmacogenomiche riguardanti la risposta farmacologica all'assunzione terapeutica di vitamina D in condizioni di ipovitaminosi. Tale informazioni potrebbero aprire nuovi fronti di ricerca riguardanti anche altre patologie ad elevato impatto sociale ed economico, in primis l'osteoporosi e diverse forme di cancro (*Krishnan AV et al. Endocrinol Metab Clin North Am 2010 39: 401-18; Bischoff-Ferrari HA et al. Int J Vitam Nutr Res 2008 78:286-92*).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI ATTESTANTI L'ATTIVITÀ SCIENTIFICA DEI PROPONENTI NELL'AREA DI RICERCA PROPOSTA

- 1 P Strazzullo, R Iacone, A Siani, FP Cappuccio, O Russo, G Barba, A Barbato, L. D'Elia, M Trevisan, E Farinaro. Relationship of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenoceptor gene to central adiposity and high blood pressure: interaction with age. Cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens* 2001, 19:399-406.
- 2 P Strazzullo, R Iacone, A Siani, G Barba, O Russo, P Russo, A Barbato, L. D'Elia, E Farinaro, FP Cappuccio. Altered renal sodium handling and hypertension in men carrying the glucagon receptor gene (Gly40Ser) variant. *Journal of Molecular Medicine* 2001; 79:574-580.
- 3 P Russo, A Siani, A Venezia, R Iacone, O Russo, G Barba, L. D'Elia, FP Cappuccio, P Strazzullo. Interaction between the C(-344)T polymorphism of CYP11B2 and age in the regulation of blood pressure and plasma aldosterone levels: cross-sectional and longitudinal findings of the Olivetti Prospective Heart Study. *J Hypertens* 2002 Sep;20 (9):1785-92.
- 4 P Strazzullo, A Barbato, F Galletti, G Barba, A Siani, R Iacone, L. D'Elia, O Russo, M Versiero, E Farinaro, FP Cappuccio. Abnormalities of renal sodium handling in the metabolic syndrome. Results of the Olivetti Heart Study. *J Hypertens* 2006 Aug; 24 (8): 1633-9.
- 5 P Strazzullo, S M Kerry, A Barbato, M Versiero, L. D'Elia & F P Cappuccio. Do statins reduce blood pressure ? A meta-analysis of randomised controlled trials.

- Hypertension 2007 Apr; 49(4): 792-8.
- 6 P Strazzullo, L. D'Elia, M Versiero. Response to Upregulation of Nitric Oxide, Inhibition of Oxidative Stress, and Antihypertensive Effects of Statins. Hypertension 2007 June; 49(6):e44.
 - 7 P Strazzullo, L. D'Elia. Response to Combination Treatment to Prevent Atherosclerosis. Hypertension 2007 Sept; 50(3): e68.
 - 8 F Galletti, L. D'Elia, G Barba, A Siani, F P Cappuccio, E Farinaro, R Iacone, O Russo, D De Palma, R Ippolito, and P Strazzullo. High Circulating Leptin Levels are Associated With Greater Risk of Hypertension in Men Independently of Body Mass and Insulin Resistance: Results of an 8-Year Follow-up Study. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93(10):3922-6.
 - 9 P. Strazzullo, L. D'Elia, N-B. Kandala, F.P. Cappuccio. Salt intake, stroke and cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. BMJ 2009;339:b4567. doi: 10.1136/bmj.b4567.
 - 10 F.P. Cappuccio, L. D'Elia, P. Strazzullo, M.A. Miller. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care 2010; 33(2):414-20.
 - 11 P. Strazzullo, L. D'Elia, G. Cairella, F. Garbagnati, F.P. Cappuccio, L. Scalfi. Excess body weight and incidence of stroke: meta-analysis of prospective studies with two million participants. Stroke 2010; 41(5):e418-26.
 - 12 F.P. Cappuccio, L. D'Elia, P. Strazzullo, M.A. Miller. Sleep duration and all cause- mortality: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Sleep 2010; 33(5):585-92.

- 13 P. Strazzullo, L. D'Elia, A. Siani. Is a trend to reduced sodium intake in the United States concealed by obesity? *Am J Clin Nutr.* 2011 Mar;93(3):670-1.
- 14 Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J.* 2011 Feb 7.
- 15 L. D'Elia, G. Barba, F.P. Cappuccio, P. Strazzullo. Potassium intake, stroke and cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol (in press)*.
- 16 Cioffi G, Faggiano P, Vizzardi E, Tarantini L, Cramariuc D, Gerdts E, de Simone G. Prognostic value of inappropriately high left ventricular mass in asymptomatic severe aortic stenosis. *Heart* 2011; 97(4):301-7.
- 17 Mureddu GF, Cioffi G, Stefanelli C, Boccanelli A, de Simone G. Compensatory or inappropriate left ventricular mass in different models of left ventricular pressure overload: comparison between patients with aortic stenosis and arterial hypertension. *J Hypertens* 2009; 27:642-649.
- 18 de Simone G, Chinali M, Galderisi M, Benincasa M, Girfoglio D, Botta I, D'addeo G, de Divitiis O. Myocardial mechano-energetic efficiency in hypertensive adults. *J Hypertens* 2009; 27:650-655.
- 19 Celentano A, Palmieri V, Esposito ND, Pietropaolo I, Crivaro M, Mureddu GF, Devereux RB, de Simone G. Inappropriate left ventricular mass in normotensive and hypertensive patients. *Am J Cardiol* 2001; 87:361-363.
- 20 Chinali M, De Marco M, D'addeo G, Benincasa M, Romano C, Galderisi M, de Simone G. Excessive increase in left ventricular mass identifies

- hypertensive subjects with clustered geometric and functional abnormalities. *J Hypertens* 2007; 25:1073-1078.
- 21 de Simone G, Verdecchia P, Pede S, Gorini M, Maggioni AP. Prognosis of inappropriate left ventricular mass in hypertension: the MAVI Study. *Hypertension* 2002; 40:470-476.
- 22 de Simone G, Kitzman DW, Palmieri V, Liu JE, Oberman A, Hopkins PN, Bella JN, Rao DC, Arnett DK, Devereux RB. Association of inappropriate left ventricular mass with systolic and diastolic dysfunction The HyperGEN study. *Am J Hypertens* 2004; 17:828-833.
- 23 Mureddu GF, Pasanisi F, Palmieri V, Celentano A, Contaldo F, de Simone G. Appropriate or inappropriate left ventricular mass in the presence or absence of prognostically adverse left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 2001; 19:1113-1119.
- 24 Olsen MH, Wachtell K, de Simone G, Palmieri V, Dige-Petersen H, Devereux RB, Ibsen H, Rokkedal J. Is inappropriate left ventricular mass related to neurohormonal factors and/or arterial changes in hypertension? a LIFE substudy. *J Hum Hypertens* 2004; 18:437-443.
- 25 de Simone G, Palmieri V, Koren MJ, Mensah GA, Roman MJ, Devereux RB. Prognostic implications of the compensatory nature of left ventricular mass in arterial hypertension. *J Hypertens* 2001; 19:119-125.
- 26 de Simone G, Muiesan ML, Ganau A, Longhini C, Verdecchia P, Palmieri V, Agabiti-Rosei E, Mancia G. Reliability and limitations of echocardiographic measurement of left ventricular mass for risk stratification and follow-up in single patients: the RES trial. Working Group on Heart and Hypertension of

- the Italian Society of Hypertension. Reliability of M-mode Echocardiographic Studies. *J Hypertens* 1999; 17:1955-1963.
- 27 Rendina D, De Filippo G, Strazzullo P. Should vitamin D status be assessed in patients with congestive heart failure? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(9):627-32.
- 28 Rendina D, De Filippo G, Zampa G, Muscariello R, Mossetti G, Strazzullo P. Characteristic clinical and biochemical profile of recurrent calcium-oxalate nephrolithiasis in patients with metabolic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2011, in press
- 29 De Filippo G, Rendina D, Strazzullo P. Childhood obesity, other cardiovascular risk factors, and premature death. *N Engl J Med.* 2010;362(19):1841
- 30 Viggiano D, De Filippo G, Rendina D, Fasolino A, D'Alessio N, Avellino N, Verga MC, Prisco AG, Sorrentino FA, Sabatini P, Chiarelli F; O.Si.M.E. Study Group. Screening of metabolic syndrome in obese children: a primary care concern. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(3):329-34.
- 31 Mossetti G, Gennari L, Rendina D, De Filippo G, Merlotti D, De Paola V, Fusco P, Esposito T, Gianfrancesco F, Martini G, Nuti R, Strazzullo P. Vitamin D receptor gene polymorphisms predict acquired resistance to clodronate treatment in patients with Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int.* 2008;83(6):414-24.
- 32 Rendina D, Mossetti G, Viceconti R, Sorrentino M, Castaldo R, Manno G, Guadagno V, Strazzullo P, Nunziata V. Association between vitamin D

- receptor gene polymorphisms and fasting idiopathic hypercalciuria in recurrent stone-forming patients. *Urology*. 2004;64(4):833-8.
- 33 Mossetti G, Rendina D, Viceconti R, Manno G, Guadagno V, Strazzullo P, Nunziata V. The relationship of 3' vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(9):2259-65.
- 34 Palomba S, Numis FG, Mossetti G, Rendina D, Vuotto P, Russo T, Zullo F, Nappi C, Nunziata V. Effectiveness of alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis: relationship with Bsm1 vitamin D receptor genotypes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;58(3):365-71.
- 35 Mossetti G, Vuotto P, Rendina D, Numis FG, Viceconti R, Giordano F, Cioffi M, Scopacasa F, Nunziata V. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis. *J Intern Med*. 2003;253(2):194-200.
- 36 Palomba S, Numis FG, Mossetti G, Rendina D, Vuotto P, Russo T, Zullo F, Nappi C, Nunziata V. Raloxifene administration in post-menopausal women with osteoporosis: effect of different Bsm1 vitamin D receptor genotypes. *Hum Reprod*. 2003;18(1):192-8.
- 37 Russo P, Siani A, Miller MA, Karanam S, Esposito T, Gianfrancesco F, Barba G, Lauria F, Strazzullo P, Cappuccio FP. Genetic variants of Y chromosome are associated with a protective lipid profile in black men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(8):1569-74.

- 38 Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Martini G, Nuti R. Update on the pharmacogenetics of the vitamin D receptor and osteoporosis. *Pharmacogenomics*.2009;10(3):417-33.
- 39 Hirschhorn JN, Gennari L. Bona fide genetic associations with bone mineral density. *N Engl J Med*. 2008;358(22):2403-5.
- 40 Palazzuoli A, Gennari L, Calabria P, Quatrini I, Vecchiato L, De Paola V, Campagna MS, Palazzuoli V, Nuti R. Relation of plasma brain natriuretic peptide levels in non-ST-elevation coronary disease and preserved systolic function to number of narrowed coronary arteries. *Am J Cardiol*. 2005;96(12):1705-10.
- 41 Palazzuoli A, Quatrini I, Vecchiato L, Calabria P, Gennari L, Martini G, Nuti R. Left ventricular diastolic function improvement by carvedilol therapy in advanced heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;45(6):563-8.
- 42 Nuti R, Martini G, Valenti R, Gambera D, Gennari L, Salvadori S, Avanzati A. Vitamin D status and bone turnover in women with acute hip fracture. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(422):208-13.
- 43 Palazzuoli A, Gennari L, Calabria P, Nami R, Martini G, Palazzuoli V, Nuti R. Left ventricular hypertrophy differences in male professional runners and in young patients suffering from mild hypertension. *Blood Press*. 2004;13(1):14-9.
- 44 Gennari L, Becherini L, Mansani R, Masi L, Falchetti A, Morelli A, Colli E, Gonnelli S, Cepollaro C, Brandi ML. FokI polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density

- and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res.* 1999;14(8):1379-86.
- 45 Gennari L, Becherini L, Masi L, Mansani R, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Montagnani A, Lentini G, Becorpi AM, Brandi ML. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):939-44.
- 46 Gennari L, Becherini L, Masi L, Gonnelli S, Cepollaro C, Martini S, Mansani R, Brandi ML. Vitamin D receptor genotypes and intestinal calcium absorption in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int.* 1997;61(6):460-3.
- 47 Taddei S, Nami R, Bruno RM, Quatrini I, Nuti R. Hypertension, left ventricular hypertrophy and chronic kidney disease. *Heart Fail Rev.* 2011, in press.
- 48 Bernini G, Moretti A, Iacconi P, Miccoli P, Nami R, Lucani B, Salvetti A. Anthropometric, haemodynamic, humoral and hormonal evaluation in patients with incidental adrenocortical adenomas before and after surgery. *Eur J Endocrinol.* 2003;148(2):213-9.
- 49 Mondillo S, Agricola E, Ammataro T, Guerrini F, Barbati R, Focardi M, Picchi A, Ballo P, Nami R. Prognostic value of dipyridamole stress echocardiography in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy, chest pain and resting electrocardiographic repolarization abnormalities. *Can J Cardiol.* 2001;17(5):571-7.
- 50 Nami R, Mondillo S, Agricola E, Lenti S, Ferro G, Nami N, Tarantino M, Glauco G, Spanò E, Gennari C. Aerobic exercise training fails to reduce

blood pressure in nondipper-type hypertension. *Am J Hypertens.* 2000;13(6 Pt 1):593-600.

- 51 Mondillo S, Sabatini L, Agricola E, Ammaturo T, Guerrini F, Barbatì R, Pastore M, Fineschi D, Nami R. Correlation between left atrial size, prothrombotic state and markers of endothelial dysfunction in patients with lone chronic nonrheumatic atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 2000;75(2-3):227-32.

PROSPETTO FINANZIARIO.

A seguire un prospetto economico riguardante l'utilizzo del finanziamento richiesto per il progetto di ricerca. Nel prospetto economico non sono compresi:

a) le ore lavorative dedicate alla realizzazione del progetto da parte del personale strutturato e non strutturato dei vari Centri di Reclutamento e Ricerca coinvolti nel progetto; b) le spese relative all'inquadramento clinico e diagnostico dei soggetti reclutati, c) le spese generali e quelle di manutenzione ordinaria degli apparecchi utilizzati.

DESCRIZIONE CAPITOLO DI SPESA	COSTO
A) Acquisto kits, reagenti e materiali di consumo per analisi ematochimiche con particolare riferimento al dosaggio degli analiti non previsti nei protocolli di diagnostica differenziale dei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale: 25- idrossicolecalciferolo, 1,25-diidrossicolecalciferolo, pro-peptidi natriuretici atriale e cerebrale (costo previsto per 800 determinazioni per metabolita) € 44.000
B) Acquisto reagenti e materiali di consumo per estrazione del DNA dalle cellule ematiche (costo previsto per 500 estrazioni) € 2.000
C) Acquisto enzimi di restrizione, reagenti e materiali di consumo per analisi di due polimorfismi del gene VDR (costo previsto per 500 campioni) € 4.000
FINANZIAMENTO RICHIESTO	€ 50.000