



Università degli Studi di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE NEFROLOGICHE XIX ciclo

SSD: MED 14

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sergio Stefoni**

**IDENTIFICAZIONE DI PROFILI DI RISCHIO  
CARDIOVASCOLARE NEL TRAPIANTATO DI RENE:  
POLIMORFISMI DI GENI COINVOLTI NEI PROCESSI  
DI INFIAMMAZIONE E DI APOPTOSI**

**Tutor**

Chiar.ma Prof.ssa Maria Scolari

**Dottoranda**

Dr.ssa Maria Cappuccilli

**Anno Accademico 2005 - 2006**

# SOMMARIO

ABSTRACT.....	4
1. INTRODUZIONE.....	6
1.1. Trapianto renale e rischio cardiovascolare.....	6
1.2. Fattori di rischio tradizionali nella MCV dopo trapianto renale.....	9
1.2.1. Ipertensione arteriosa.....	9
1.2.2. Dislipidemia.....	10
1.2.3. Sindrome metabolica: diabete e obesità.....	12
1.2.4. Fumo.....	14
1.3. Fattori non tradizionali.....	14
1.3.1. Stato infiammatorio.....	15
1.3.2. Iperomocisteinemia.....	18
1.3.3. La terapia immunosoppressiva.....	21
1.3.4. Anemia.....	22
1.3.5. Nefropatia Cronica da Trapianto.....	23
1.3.6. Alterazioni della coagulazione.....	24
1.3.7. Stress ossidativo.....	24
1.3.8. Apoptosi.....	25
1.4. Fattori genetici.....	26
1.4.1. Polimorfismi di geni coinvolti nei processi d'infiammazione.....	27
1.4.1.1. Tumor Necrosis Factor alpha.....	28
1.4.1.2. Transforming Growth Factor beta.....	29
1.4.1.3. Interleuchina 10.....	31
1.4.1.4. Interleuchina 6.....	32
1.4.1.5. Interferon gamma.....	33
1.4.1.6. Interleuchina 8.....	34
1.4.2. Polimorfismi di geni coinvolti nell'apoptosi.....	35
1.4.2.1. Fas.....	35
1.4.2.2. Caspasi 9.....	36
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	37
3. MATERIALI E METODI.....	38
3.1. Pazienti.....	38
3.2. Raccolta e stoccaggio dei campioni biologici.....	40
3.3. Estrazione di DNA genomico.....	40
3.4. Analisi del genotipo.....	41
3.4.1. Analisi RFLP per IL-8/T-251A, Fas/G-670A e Casp9/R221Q.....	41

3.4.2. <i>Analisi PCR-SSP per TNF-<math>\alpha</math>/G-308A, TGF-<math>\beta</math>/L10P, TGF-<math>\beta</math>/R25P, IL-10/G-1082A, IL-10/C-819T, IL-10/C-592A, IL-6/G-174C e IFN-<math>\gamma</math>/T+874A</i> .....	48
3.5. Dosaggio dei fattori sierici t-PA, MCP-1, sVCAM-1, sP-selectin e sCD40L.....	50
3.6. Analisi statistica.....	52
4. RISULTATI.....	54
4.1. Genotipo di TNF- $\alpha$ .....	54
4.2. Genotipo di TGF- $\beta$ .....	56
4.3. Genotipo di IL-10.....	58
4.4. Genotipo di IL-6.....	60
4.5. Genotipo di IFN- $\gamma$ .....	62
4.6. Genotipo di IL-8.....	63
4.7. Genotipo di Fas.....	65
4.8. Genotipo di Caspasi 9.....	66
5. DISCUSSIONE.....	68
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE.....	74
7. BIBLIOGRAFIA.....	76
8. RINGRAZIAMENTI.....	85

## ABSTRACT

### **Identification of cardiovascular risk profiles in kidney transplant: gene polymorphisms involved in inflammation and apoptosis**

**Introduction.** Cardiovascular disease (CVD) represents the main cause of morbidity and mortality in kidney recipients. This study was undertaken to assess the impact of functional polymorphisms located in cytokine and apoptosis genes on CVD after kidney transplantation.

Cytokine polymorphisms, generally located in gene regulatory regions, are associated with high and low cytokine production and are likely to modulate the magnitude of inflammatory responses following transplantation, depending on the balance between the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The role of apoptosis in atherosclerosis has not been completely elucidated, and here we explored the hypothesis that the heterogeneity in cardiovascular risk in kidney recipients may also be linked to functional polymorphisms involved in apoptosis induction.

**Purpose.** In the search for relevant genetic markers of predisposition to CVD after renal transplant, the present investigation was undertaken to identify the clinical impact of polymorphisms of cytokines TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-8 and of apoptosis genes Fas and Caspase 9 in a population of kidney transplant recipients.

**Materials and methods.** The study involved 167 patients who received cadaveric kidney transplantation at our centre between 1997 and 2005 (minimum follow-up of 12 months); 35 of them had experienced cardiovascular events (CVD group) and 132 had no cardiovascular complications (non-CVD group). Genotyping was performed using RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) for RFLP per IL-8/T-251A, Fas/G-670A e Casp9/R221Q polymorphism and SSP (Sequence Specific Primer) for TNF- $\alpha$ /G-308A, TGF- $\beta$ /L10P, TGF- $\beta$ /R25P, IL-10/G-1082A, IL-10/C-819T, IL-10/C-592A, IL-6/G-174C, IFN- $\gamma$ /T+874A polymorphisms.

**Results.** We found a significant difference in TNF- $\alpha$  and IL-10 genotype frequencies between the patients who had suffered cardiovascular events and those with no CVD history. The high producer genotype for proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  appeared to have a significantly superior prevalence in the CVD group compared to the non-CVD group (40.0% vs 21.2%) and it resulted in a 2.4-fold increased cardiovascular risk (OR=2.361; p=0.0289). On the other hand, the high producer genotype for the anti-inflammatory cytokine IL-10 was found in 2.8% of the CVD group and in 16.7% of non-CVD group; logistic regression showed a 0.3-fold reduced risk of CVD associated with genetically determined high IL-10 production (OR=0.278; p<0.0001). The other polymorphisms did not prove to have any impact on CVD.

**Conclusions.** TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms might represent cardiovascular risk markers in renal transplant recipients.

**Parole chiave (*Keywords*):**

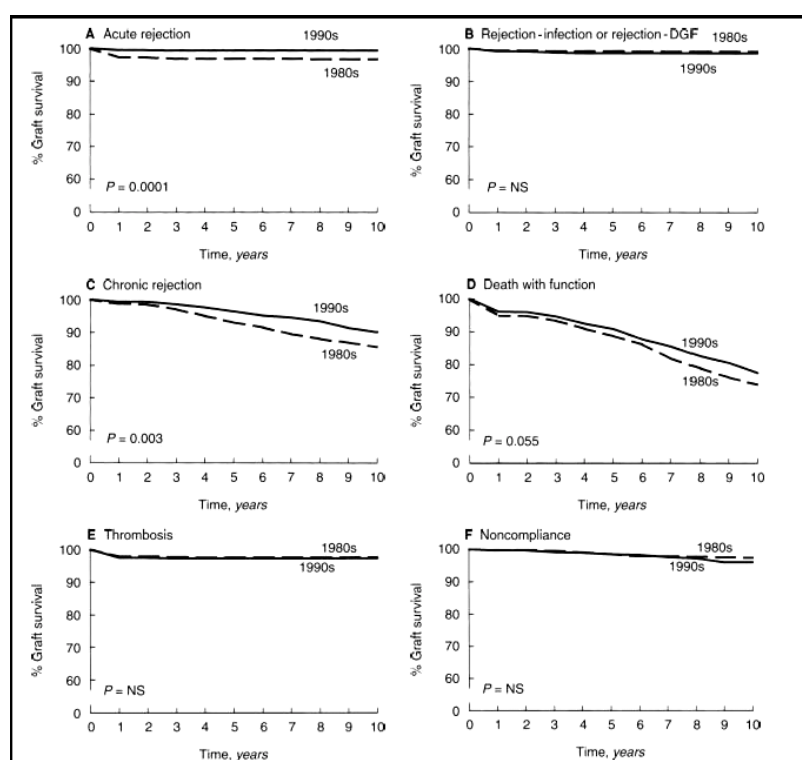
Trapianto renale, Malattia Cardiovascolare, Infiammazione, Apoptosi, Fattori genetici, Citochine, Polimorfismi

*Kidney transplant, Cardiovascular disease, Inflammation, Apoptosis, Genetic factors, Cytokines, Polymorphisms*

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Trapianto renale e rischio cardiovascolare

Il trapianto renale rappresenta l'opzione terapeutica d'elezione per il paziente con malattie renali croniche, migliorandone sia l'aspettativa che la qualità di vita. Tuttavia, nonostante i notevoli progressi in termini di tecnica chirurgica, di conoscenze immunologiche e di terapia immunosoppressiva, ad oggi la durata del trapianto renale è ancora limitata nel tempo. In tutte le casistiche, la morte con il rene funzionante rappresenta la causa preminente di perdita del trapianto (Figura 1), rendendo conto di circa il 42,5% di tutti i fallimenti del trapianto nei primi 10 anni [Ojo 2000, Matas 2002].



**Figura 1.** Cause principali di perdita del graft negli anni '80 e negli anni '90: (A) rigetto acuto, (B) rigetto acuto + delayed graft function o infezione, (C) rigetto cronico, (D) morte con rene funzionante, (E) trombosi e (F) non-compliance [Matas 2002].

La mortalità in corso di trapianto è certamente un fenomeno a genesi multifattoriale in cui ha un ruolo predominante come causa di morte la

patologia cardiovascolare (Tabella 1) [Ojo 2000, Matas 2002, Rigatto 2002, Diaz 2003, Shimmura 2004].

Referenza	N° trapianti	%
Ojo AO <i>et al.</i> , Kidney Int. 2000	86.502	42
Matas AJ <i>et al.</i> , Kidney Int. 2002	1.467	48
Rigatto C <i>et al.</i> , J Am Soc Nephrol. 2002	638	46
Diaz JM <i>et al.</i> , Transplant Proc. 2003	233	38
Shimmura H <i>et al.</i> , Transplant Proc. 2004	1594	33

**Tabella 1.** Incidenza della morte cardiovascolare nei trapiantati renali deceduti con graft funzionante.

La malattia cardiovascolare (MCV) è quindi un importante fattore di morbilità e mortalità nei pazienti sottoposti a trapianto renale. Con tale termine si indicano un insieme di disordini cardiaci (cardiopatía ischemica, scompenso cardiaco congestizio, ipertrofia ventricolare sinistra), cerebrovascolari (ictus ischemico, arteriopatie dei tronchi sopraaortici), o vascolari periferici (arteriopatie obliteranti periferiche e viscerali).

La notevole incidenza di complicanze cardiovascolari nel trapiantato renale è legata al fatto che tale tipo di paziente è esposto ad un elevato rischio aterogeno fin dagli esordi dell'insufficienza renale. La sommatoria dei vari fattori di rischio (Tabella 2) fa sì che al momento del trapianto il paziente sia portatore di patologia cardiovascolare più o meno evidente sul piano clinico o quantomeno di una condizione predisponente [Sarnak 2003]. Tale quadro può influenzare pesantemente la prognosi del trapiantato renale, generalmente attraverso uno stadio intermedio caratterizzato dalla comparsa e dalla progressione del danno d'organo che può portare fino allo sviluppo di eventi cardiovascolari maggiori.

<b>Fattori di rischio tradizionali</b>	<b>Fattori di rischio non tradizionali</b>
Età avanzata	Infiammazione
Sesso maschile	Iperomocisteinemia
Razza bianca	Isoforme Lipoproteina(a)
Ipertensione arteriosa	Lipoproteine remnants
Aumento colesterolo LDL	Anemia
Riduzione colesterolo HDL	Albuminuria/proteinuria
Diabete	Alterato metabolismo calcio/fosforo
Obesità	Espansione della volemia
Fumo	Sbilancio elettrolitico
Sedentarietà	Stress ossidativo
Menopausa	Malnutrizione
Familiarità per MCV	Fattori trombogenici
Ipertrofia ventricolare sinistra	Alterato bilancio ossido nitrico/endotelina

**Tabella 2.** Fattori di rischio cardiovascolare tradizionali e non tradizionali nell'insufficienza renale [modificata da Sarnak 2003].

Nel corso della storia clinica di un trapiantato, dunque, ai fattori di rischio tradizionali [Culleton 1999], si aggiungono quelli del pre-trapianto correlati all'uremia e alla durata del trattamento sostitutivo e quelli del post-trapianto legati principalmente alla terapia immunosoppressiva.

I principali fattori di rischio tradizionali sono quelli indicati dal Framingham Heart Study [Wilson 1998], ovvero ipertensione, diabete, ipercolesterolemia, fumo. L'equazione di rischio di Framingham non è tuttavia sufficiente per stimare tutti i fattori di rischio cardiovascolare dei soggetti nefropatici [Longenecker 2002], dal momento che i fattori "non tradizionali" possono giocare un ruolo rilevante nella progressione della patologia cardiovascolare dalla comparsa della nefropatia fino al trapianto [Rattazzi 2003, Busch 2004]. Tali fattori o condizioni di rischio definiti "emergenti" sono in gran parte correlabili allo stato fisiopatologico e alle caratteristiche genetiche del paziente trapiantato: lo stato infiammatorio, la terapia immunosoppressiva, l'iperomocisteinemia, l'anemia, le anomalie del metabolismo calcio-fosforo, le alterazioni della coagulazione, i prodotti di ossidazione lipidica.



## **1.2. Fattori di rischio tradizionali nella MCV dopo trapianto renale**

Nei trapiantati renali, i fattori tradizionali possono avere un impatto differente nello sviluppo di MCV rispetto alla popolazione generale sia qualitativamente che quantitativamente: ad esempio tali pazienti possono avere una lunga storia ed un grado più severo di ipertensione oppure essere in trattamento farmacologico da diversi anni. Inoltre, relativamente al “peso” dei diversi fattori di rischio tradizionali, i dati attuali sono contrastanti. Per Kasiske *et al.*, l’età, il sesso maschile, la presenza di vasculopatia extracardiaca, il numero di rigetti sono i maggiori fattori predittivi di cardiopatia ischemica mentre non lo sono l’ipertensione e la dislipidemia [Kasiske 1998]. Altri autori hanno invece rilevato come l’iperlipidemia sia un fattore predittivo di MCV dopo trapianto [Keane 1997].

### **1.2.1. Ipertensione arteriosa**

Alcuni studi hanno segnalato come la stretta associazione tra ipertensione arteriosa e MCV esistente nella popolazione generale sia riscontrabile anche nei portatori di trapianto renale [Aakhus 1999, Aakhus 2004]. Inoltre, esistono diverse evidenze che indicano l’ipertensione arteriosa, in particolare la sistolica, come un importante fattore di rischio per la sopravvivenza sia del paziente sia del rene trapiantato. Uno studio retrospettivo di Opelz *et al.* su 29.751 trapiantati renali da donatore cadavere ha dimostrato come l’ipertensione arteriosa sistolica incida significativamente sulla sopravvivenza dell’organo [Opelz 1998]. La correlazione fra ipertensione e disfunzione cronica del graft è stata osservata in riceventi senza storia di rigetto e livelli normali di creatininemia ad un anno dal trapianto [Ritz 2000].

La terapia immunosoppressiva svolge un ruolo sicuramente importante nell’azione ipertensiva. La ciclosporina, il tacrolimus e gli steroidi sembrano esercitare un effetto negativo sulla pressione arteriosa, mentre non è stata dimostrata alcuna azione ipertensivizzante per azatioprina, micofenolato e rapamicina [Opelz 1998, Johnson 2001]. Il principale meccanismo attraverso

il quale gli inibitori della calcineurina causano ipertensione è rappresentato dalla sodio-ritenzione con conseguente espansione della volemia e relativa soppressione dell'asse renina-angiotensina [Midtvedt 2000, Park 2005, Castillo-Lugo 2005]. Il tacrolimus sembrerebbe avere un effetto vasocostrittore minore rispetto alla ciclosporina ed alcuni studi di conversione da ciclosporina a tacrolimus evidenziano un miglioramento dell'ipertensione [Copley 1998]. L'interpretazione di questi risultati è comunque complicata dal fatto che è la stessa funzione renale che spesso migliora in seguito a tale conversione. Ad esempio, un recente lavoro di Gelens *et al.* su una casistica limitata di 34 pazienti ha rilevato, a 3 mesi dalla conversione da ciclosporina a tacrolimus, un miglioramento del profilo lipidico (colesterolo totale, colesterolo HDL e trigliceridi), della funzione renale, ma non della pressione arteriosa e delle proprietà della parete delle arterie, probabilmente in conseguenza del fatto che questi pazienti erano stati in precedenza trattati per lungo tempo (>10 anni) con ciclosporina [Gelens 2005].

Infine, anche riguardo all'influenza degli steroidi sull'ipertensione post-trapianto, i dati attuali non sono certi. Molti autori supportano l'ipotesi che gli steroidi predispongano i pazienti all'ipertensione dopo trapianto renale; in particolare, studi randomizzati che prevedevano la sospensione dello steroide ne confermano l'effetto benefico sull'ipertensione, sebbene l'apparente miglioramento sembri essere transitorio e non più evidente ad un anno dalla sospensione dello steroide stesso [Ratcliffe 1996, Matl 2000].

Da questo contesto, emerge come non ci sia un unico farmaco o classe di farmaci di scelta per il trattamento. Il raggiungimento di dosi ottimali di farmaci immunosoppressori, specificatamente steroidi ed inibitori della calcineurina, è sicuramente essenziale per un migliore management dell'ipertensione.

### ***1.2.2. Dislipidemia***

Le anomalie nel metabolismo dei lipidi, già frequenti nei pazienti uremici [Lee 2002, Majumdar 2000], sembrano persino accentuarsi dopo

trapianto renale. L'iperlipidemia nel paziente trapiantato di rene è osservabile già dai primi giorni dopo il trapianto con una prevalenza stimata intorno al 60% [Massy 2001]. Alcune evidenze suggeriscono, inoltre, una correlazione tra dislipidemia e nefropatia cronica da trapianto [El-Amm 2006, Kasiske 1999, Cristol 1998].

Il profilo lipoproteico nel post-trapianto è caratterizzato da un aumento del colesterolo totale e del colesterolo LDL, delle VLDL e dei trigliceridi. Le LDL sembrano inoltre essere più suscettibili all'ossidazione, mentre i livelli di antiossidanti sono più bassi nei pazienti trapiantati trattati con ciclosporina [Sutherland 1995]. Riguardo all'ipercolesterolemia, i meccanismi maggiormente coinvolti nella progressione delle lesioni vascolari aterosclerotiche sono l'ossidazione delle LDL e l'aumento della Lipoproteina(a) [Lp(a)].

Nello sviluppo di iperdislipidemia dopo trapianto di rene sono implicati molteplici fattori: la comparsa di proteinuria, la disfunzione cronica del graft, la presenza di diabete, l'obesità, l'età avanzata, l'uso di diuretici e/o  $\beta$ -bloccanti e i fattori genetici.

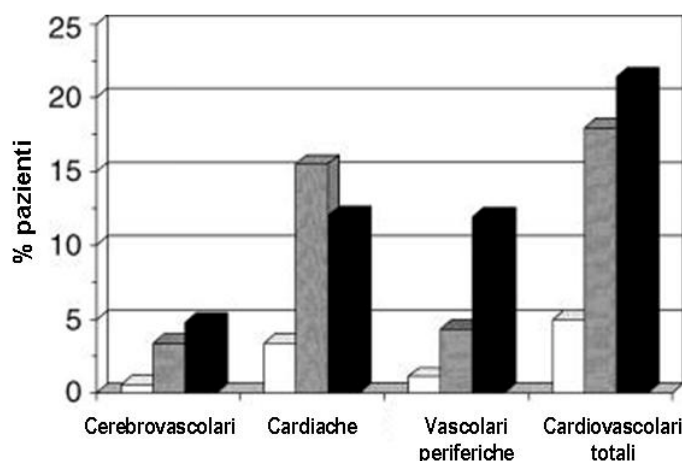
Come per altre complicanze che insorgono dopo trapianto renale, la terapia immunosoppressiva può avere un ruolo rilevante sull'alterazione del profilo lipidico, con effetti differenziati da farmaco a farmaco (Tabella 3).

Steroidi	++++
Ciclosporina	++++
Tacrolimus	++
Sirolimus	+++
Azatioprina	+/-
Micofenolato	+/-

**Tabella 3.** Potere iperlipidemizzante di alcuni farmaci immunosoppressori [modificata da Fellstrom 2000].

### 1.2.3. *Sindrome metabolica: diabete e obesità*

L'insorgenza di diabete mellito de novo dopo trapianto d'organo costituisce una frequente complicanza con ricadute sulla sopravvivenza sia del graft che del paziente, oltre ad essere un rilevante fattore di rischio per MCV (Figura 2) [Cosio 2005].



**Figura 2.** Incidenza di specifiche complicanze cardiovascolari dopo trapianto renale in pazienti normoglicemici (bianco, N=249), con intolleranza glucidica (grigio, N=48) o diabetici (nero, N=43) [modificata da Cosio 2005].

Nei pazienti trapiantati di età compresa tra 55 e 64 anni, il rischio relativo di morte per cardiopatia ischemica è aumentato di circa 20 volte rispetto alla popolazione generale, contro le 6,4 dei trapiantati di pari età senza diabete [Lindholm 1995]. Dopo trapianto renale, la presenza di diabete contribuisce ad aumentare l'incidenza di altri fattori di rischio cardiovascolare come l'ipertensione arteriosa e l'iperlipidemia [Hjelmsaeth 2001]. Tra le maggiori conseguenze del diabete sembrerebbe esserci anche un aumentato rischio di rigetto. I pazienti, inoltre, sono certamente più esposti alle infezioni e alle complicanze degenerative del diabete.

Tra i fattori di rischio per lo sviluppo di diabete post-trapianto vi sono la storia familiare, l'età, la razza, l'indice di massa corporea (Body Mass Index, BMI), la predisposizione genetica [Kasiske 2003, Ritz 2000] e soprattutto le terapie immunosoppressive.

Gli steroidi hanno un effetto diabetogeno legato alla dose: un incremento della dose di 0,01 mg/kg/die comporta un aumento del rischio di diabete mellito post-trapianto del 5% e di intolleranza glucidica del 4% [Hjelmsaeth 1997].

Gli inibitori della calcineurina, ciclosporina e tacrolimus, seppure siano molecole non strutturalmente correlate, hanno un effetto diabetogeno legato ad un meccanismo comune a livello della cellula beta-pancreatica. Il processo di secrezione insulinica, da parte delle cellule beta è  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente. Normalmente il glucosio entra nella cellula beta tramite una specifica proteina di trasporto, chiamata GLUT-2. La trasformazione in glucosio-6-fosfato, attiva la glicolisi, la quale genera ATP. L'aumento intracellulare dell'ATP comporta l'inibizione e la chiusura dei canali  $\text{K}^{+}$ -sensibili, la depolarizzazione della membrana plasmatica e l'ingresso del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare unitamente alla mobilizzazione del  $\text{Ca}^{2+}$  dai depositi intracellulari. Questi processi determinano l'esocitosi dei granuli contenenti insulina, con liberazione dell'insulina stessa nel torrente circolatorio. Pertanto, qualsiasi interferenza sul metabolismo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare da parte di agenti immunosoppressivi ha implicazioni sulla secrezione di insulina. Il tacrolimus esporrebbe i pazienti ad un rischio maggiore di diabete, dal momento che probabilmente esercita un'azione tossica diretta sulle cellule insulari [Tamura 1995].

L'azatioprina, il micofenolato mofetile non sembrano avere effetti evidenti sul metabolismo glucidico [Ducloux 1998], mentre riguardo alla rapamicina i dati non sono ancora del tutto chiari. Seppure tale agente immunosoppressore non abbia un effetto diabetogeno diretto, alcuni recenti studi hanno mostrato come nei pazienti trapiantati trattati con regimi a base di sirolimus e ciclosporina, vi sia una aumentata incidenza di intolleranza glucidica o diabete rispetto ai pazienti in terapia con la sola ciclosporina, probabilmente per una tossicità pleiotropica derivante da tale combinazione [Romagnoli 2006].

Riguardo al ruolo dell'obesità, la stretta relazione dell'eccessivo accumulo di grasso viscerale con morbilità e mortalità cardiovascolare è ben documentato nella popolazione generale, in quanto si associa ad altri fattori di rischio come dislipidemia, insulino-resistenza, elevate concentrazioni di PAI-1, ipertrofia ventricolare sinistra, aumento dello spessore delle pareti e del diametro del ventricolo sinistro [Abate 1999].

Nei pazienti trapiantati con BMI superiore a 30 kg/m<sup>2</sup>, gli eventi cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte.

#### ***1.2.4. Fumo***

Nella popolazione generale, l'associazione tra rischio cardiovascolare e tabagismo è ben documentata. Nel paziente trapiantato, uno studio di Kasiske del 2000 ha dimostrato che il consumo di più di 25 pacchetti di sigarette l'anno al momento del trapianto si associa con un'alta prevalenza di morbilità e mortalità cardiovascolare che sono rispettivamente aumentate di 2,14 e 1,42 volte rispetto ai trapiantati non fumatori [Kasiske 2000]. È stato dimostrato che nel trapianto renale, il ruolo negativo del fumo è quantitativamente sovrapponibile a quello del diabete [Cosio 1999].

### **1.3. Fattori non tradizionali**

Nel paziente nefropatico e nel trapiantato renale, oltre ai fattori di rischio cardiovascolare tradizionali, un peso significativo è attribuito ai fattori di rischio emergenti. Molti di questi sono "peculiari" del paziente uremico in quanto correlabili alla sua storia clinica dall'esordio dell'insufficienza renale fino al trapianto renale: stato infiammatorio, iperomocisteinemia, terapia immunosoppressiva, anemia, disfunzione cronica dell'organo trapiantato, alterazioni della coagulazione, stress ossidativo, regolazione dell'apoptosi.

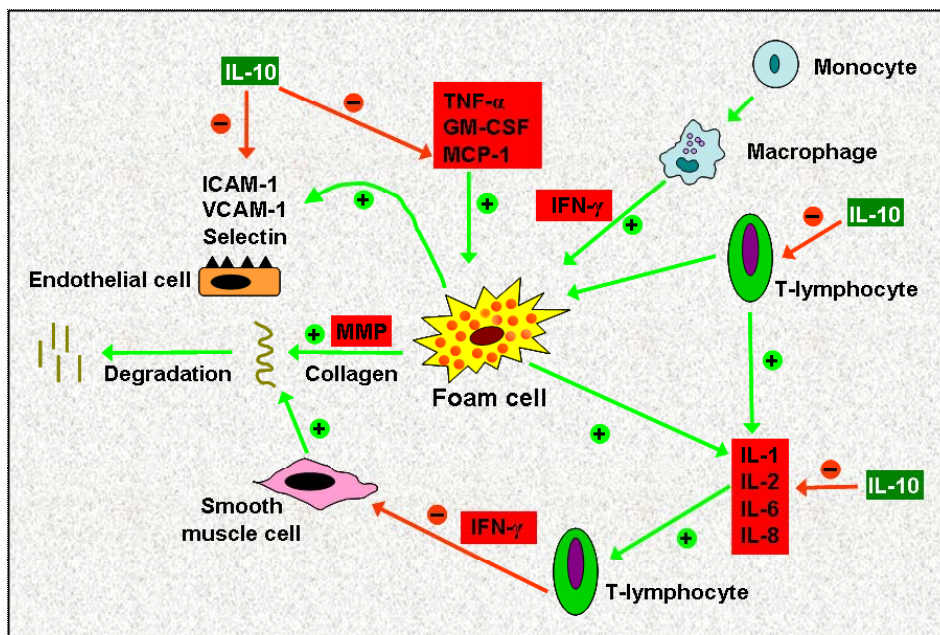
### ***1.3.1. Stato infiammatorio***

L'aterosclerosi, per lungo tempo considerata come una malattia del metabolismo legata principalmente all'accumulo lipidico, è ora ritenuta una patologia infiammatoria. Le prime evidenze furono scoperte nel 1958, quando si osservò che i leucociti aderivano all'endotelio delle lesioni aterosclerotiche. Oggi è noto che i linfociti e i monociti si legano ad alcune molecole di adesione, le VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), espresse dall'endotelio dopo che questo è stato attivato da citochine pro-infiammatorie o da componenti di lipoproteine ossidate. Inoltre, l'espressione di VCAM-1 aumenta sulle cellule endoteliali che sovrastano una lesione aterosclerotica iniziale [Holmberg 2000]. I processi infiammatori sono responsabili dell'instabilità della placca e di una sua eventuale rottura [Amer 1993]. È stato osservato, infatti, che le molecole di adesione solubili sono coinvolte nello sviluppo della placca aterosclerotica e la loro presenza è documentata non solo nella placca, ma anche nel plasma ottenuto dai pazienti. In particolare, oltre a VCAM-1, la P-selectin e ICAM-1 sono fortemente espresse nell'endotelio che sovrasta la placca aterosclerotica umana [Lafontan 1996]. Il reclutamento dei monociti circolanti, tramite sostanze chemioattive come la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), determina il loro legame a recettori endoteliali e la migrazione nell'intima arteriosa, dove possono fagocitare lipidi attraverso recettori scavenger e trasformarsi in cellule schiumose [Libby 2002]. A loro volta, i linfociti T vengono attivati da sostanze pro-infiammatorie, iniziando a produrre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , potente attivatore di macrofagi, cellule endoteliali e muscolari. Una molecola con un ruolo centrale in tali meccanismi è il ligando del CD40 (CD40L o CD154), recettore normalmente coinvolto nell'interazione tra linfociti T e linfociti B per la produzione di immunoglobuline. Il CD40L è in grado di stimolare l'espressione di molecole di adesione come la VCAM-1, di attivare la caspasi-1 coinvolta nei processi di maturazione delle citochine e nell'apoptosi, di promuovere l'espressione della stromelisin 3 (enzima di degradazione del

connettivo molto presente nel rimodellamento arterioso) e di indurre la produzione di tissue factor da parte dei macrofagi.

Questo modello sembrerebbe ipotizzare che tanto più i processi infiammatori sono attivi a livello della placca tanto più essa diverrebbe “instabile”, ovvero pronta a ulcerazioni, emorragie e rotture a causa degli enzimi rilasciati da macrofagi e cellule attivate che esporrebbero il materiale altamente trombogenico contenuto al suo interno, precipitando così l’evento della trombosi. Tutto questo processo è modulato dall’equilibrio tra fattori pro-infiammatori preponderanti nella placca instabile (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, metalloproteinasi) e fattori anti-infiammatori. Tra questi ultimi, un ruolo principale ha l’IL-10, citochina con potenti attività anti-flogistiche in grado di limitare la risposta infiammatoria locale e di stabilizzare la placca [Perez Fernandez 2002].

Da ciò si evince che esiste un nesso tra livello infiammatorio, storia naturale della placca e storia clinica del paziente (Figura 3).



**Figura 3.** Mediatori dell’infiammazione e aterosclerosi [modificata da Perez Fernandez 2002].

Nello stretto rapporto tra infiammazione ed aterosclerosi ha un ruolo anche la presenza di patogeni specifici, inclusi *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter*



*pylori*, *Cytomegalovirus* (CMV) ed *Herpes virus* [Frishman 1998]. I potenziali meccanismi derivano ad esempio dal rilascio di endotossine da parte di agenti batterici che stimolano i monociti, inducono la secrezione di IL-1 $\beta$  e di TNF- $\alpha$ , aumentano l'adesività piastrinica, riducono i livelli di antitrombina III e downregolano la fibrinolisi [Nieminen 1993]. Le infezioni possono inoltre alterare il metabolismo glicidico e lipidico, con conseguenze metaboliche responsabili di incrementare il rischio cardiovascolare.

Relativamente agli effetti dello stato infiammatorio nella MCV dopo trapianto renale vi è, a fronte dei molteplici dati sperimentali, un limitato numero di evidenze cliniche.

Particolare impatto ha nel paziente trapiantato l'infezione da CMV, che può contribuire al danno cardiovascolare attraverso vari meccanismi. Uno di questi è l'aumento dell'infiltrato perivascolare monocito-macrofagico che ha un ruolo cardine nel processo aterosclerotico [Li 1998]. Il CMV può inoltre causare danno endoteliale con conseguente sviluppo di lesioni intimali. Le citochine rilasciate durante una risposta alle cellule infettate da CMV stimolano l'espressione sulle cellule endoteliali di ICAM-1 e VCAM-1 [Fuggle 1998], favorendo l'interazione dei leucociti mononucleati circolanti con l'endotelio vascolare, evento precoce nell'aterosclerosi [Frishman 1998]. È interessante sottolineare che, nel trapiantato renale, VCAM-1 ed ICAM-1 sono upregolate ed iperesprese a livello dei capillari peritubulari, dei tubuli prossimali e dell'endotelio, in particolare durante gli episodi di attivazione del sistema immunitario, sia acuti che cronici [Fuggle 1998].

Anche l'aumento dei livelli di alcuni fattori della coagulazione come fibrinogeno, fattore VII e fattore di von Willebrand sembrano contribuire al rischio cardiovascolare dopo trapianto [Frishman 1998]. Uno stato protrombotico legato ad un'alterata fibrinolisi può anche manifestarsi in alcuni pazienti come conseguenza degli elevati livelli di inibitore dell'attivazione del plasminogeno (PAI-1), che risulta particolarmente elevato nei trapiantati in terapia con ciclosporina, nei diabetici e nei dislipidemicici [Verpooten 1996].

Oltre che alle infezioni e ai disordini coagulativi, l'impatto dell'infiammazione sulla progressione del danno cardiovascolare dopo trapianto è correlabile alla riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (VGF) e della clearance delle citochine. Implicitamente sembra quindi esistere una correlazione tra il rigetto, che comporta un release citochinico, il deterioramento della funzione renale e la patologia cardiovascolare. Se tale legame fosse definitivamente dimostrato esisterebbe un link patogenetico comune fra MCV e nefropatia cronica da trapianto, le cui caratteristiche cliniche suggestivamente sono: ipertensione, dislipidemia.

### ***1.3.2. Iperomocisteinemia***

L'iperomocisteinemia è un fattore di rischio indipendente per malattie coronariche, del circolo cerebrale, dei vasi periferici, comune in pazienti in emodialisi e in trapiantati renali. L'omocisteina infatti è un prodotto intermedio del metabolismo dell'aminoacido metionina, e viene metabolizzata in due modi: trans-solforata in cisteina o rimetilata in metionina. Eventuali alterazioni a livello di una di questi due vie porta ad un incremento dei livelli plasmatici di omocisteina. Un eccesso di tale molecola può avere effetti angiotossici legati a molteplici meccanismi fisiopatologici reciprocamente autopotenziantsi: (a) ridotta produzione endoteliale di ossido nitrico, (b) alterazione dei processi ossidativi, (c) aumento delle attività protrombotiche in conseguenza degli elevati livelli dei fattori XII e V della cascata coagulativa, (d) riduzione delle proprietà antitrombotiche endoteliali (Proteina C, Trombomodulina, Eparansolfato). Inoltre l'omocisteina sembra indurre una ridotta attività del sistema fibrinolitico e svolgere un effetto di potenziamento del legame tra Lp(a) e fibrina [Ross 1999]. La maggior parte degli studi condotti nei pazienti uremici ha mostrato la presenza di iperomocisteinemia in oltre il 90% dei soggetti, con livelli plasmatici di omocisteina incrementati da due a quattro volte rispetto alla norma [Massy 1994].

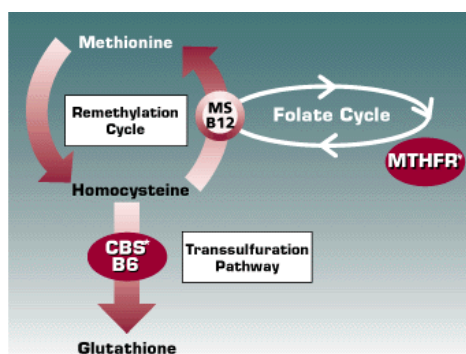
L'iperomocisteinemia ha un'alta prevalenza anche nei trapiantati renali [Dimèny 1998] e può contribuire ad incrementare il rischio cardiovascolare. Il

meccanismo di sviluppo dell'iperomocisteinemia dopo trapianto renale non è ancora del tutto noto. Età e sesso sembrano non essere correlati all'iperomocisteinemia [Massy 1994], mentre lo sono il deficit di vitamina B12 e di folati, seppure i loro livelli nei pazienti trapiantati di rene siano spesso nella norma [Wilcken 1981]. È stato documentato, invece, il deficit di piridossal fosfato associato con iperomocisteinemia da carico di post-metionina [Lacour 1983]. Sembra che la perdita della funzione renale abbia un ruolo causale nell'iperomocisteinemia: elevati livelli sierici di omocisteina sono infatti positivamente correlati con quelli di creatinina e con la riduzione del filtrato glomerulare [Bostom 1999].

Anche la terapia immunosoppressiva, in particolare la dose cumulativa di steroidi, può contribuire ad alterare i livelli plasmatici di omocisteina totale [Massy 1994], mentre più incerti sono gli effetti della ciclosporina. Arnadottir *et al.* hanno dimostrato che pazienti trattati con ciclosporina presentano livelli plasmatici significativamente più alti rispetto ai soggetti trattati con azatioprina e steroidi [Arnadottir 1996]. Al contrario, un'analisi multivariata di Ducloux *et al.* dimostravano che la ciclosporina non sembra influenzare i valori dell'omocisteina totale nei trapiantati [Ducloux 1998].

È importante notare che le lesioni vascolari riscontrate in pazienti iperomocisteinemici sono caratterizzate da spessore fibromuscolare dei piccoli vasi [Mc Cully 1969] e ricordano gli aspetti della nefropatia cronica del trapianto [Solez 1994], suggerendo che elevati valori di omocisteina possono influenzare la sopravvivenza del graft a lungo termine promuovendo sclerosi vascolare nel rene trapiantato. Poiché i livelli plasmatici di folati e di vitamina B12 sono inversamente correlati con quelli dell'omocisteina, mentre i livelli di vitamina B6 sono inversamente associati con un incremento del carico di derivati della metionina nel plasma rispetto ai livelli di omocisteina totali, una supplementazione con queste vitamine può teoricamente migliorare il metabolismo dell'omocisteina stessa sia nella popolazione generale [Marcucci 2003] che nei pazienti trapiantati [Bostom 1997].

Recentemente è stata, inoltre, osservata una forte influenza del polimorfismo della metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) sulla concentrazione ematica di omocisteina nei pazienti trapiantati [Fodinger 1999]. La MTHFR è un enzima cruciale coinvolto nel pathway di rimetilazione della omocisteina a metionina [Shan 1999]. Esso catalizza la conversione del 5,10-metilenetetraidrofolato in 5-metiltetraidrofolato, il donatore di metili per la rimetilazione dell'omocisteina a metionina (Figura 4).



**Figura 4.** Ruolo dell'enzima MTHFR nel metabolismo dell'omocisteina.

Nel 1995, Frosst *et al.* hanno identificato per la prima volta un polimorfismo molto comune del gene MTHFR, dovuto alla sostituzione di una C in T al nucleotide 677 che determina una riduzione dell'attività enzimatica dal 35 al 50% [Frosst 1995]. La presenza dell'allele T è stata associata ad elevati livelli plasmatici di omocisteina e rappresenta un fattore di rischio indipendente per malattia cardiovascolare nella popolazione generale [Dedoussis 2005].

Sul ruolo del genotipo MTHFR in rapporto alle complicanze del trapianto renale vi sono alcuni studi, talvolta in disaccordo.

Un lavoro del 1998 di Sharma ed uno successivo di Hagen non evidenziavano correlazioni tra questo polimorfismo e la sopravvivenza del rene trapiantato [Sharma 1998, Hagen 2001], mentre Viklický e coll. hanno riportato come i portatori dell'allele T siano esposti ad un rischio di andare incontro a disfunzione cronica del graft ad un anno dal trapianto incrementato di 3,9 volte [Viklický 2004].

### ***1.3.3. La terapia immunosoppressiva***

Alcuni dei farmaci immunosoppressori utilizzati nel trapianto renale costituiscono un ulteriore fattore di rischio cardiovascolare. Gli steroidi sono causa di ipertensione (modificazioni emodinamiche ed ormonali, ritenzione idrosalina), dislipidemia e diabete mellito de novo con un meccanismo dose dipendente.

Gli inibitori della calcineurina (ciclosporina e tacrolimus) possiedono un'azione ipertensivante e possono determinare diabete mellito de novo post-trapianto. I meccanismi con cui la ciclosporina può causare ipertensione sono numerosi: (a) aumentata produzione di endotelina-1, (b) attivazione del sistema renina-angiotensina, (c) ridotta produzione di ossido nitrico, (d) aumentata produzione di TGF- $\beta$ , (e) alterato bilancio prostaglandinico, (f) aumento dell'attività simpatica. Tali alterazioni portano a una riduzione della VGF e del flusso ematico renale che, a loro volta, determinano una ritenzione idrosalina, un incremento del comparto extracellulare e della gittata cardiaca. Il tacrolimus sembrerebbe esercitare una minore azione ipertensivante rispetto alla ciclosporina, seppure i meccanismi con cui gli inibitori della calcineurina agiscono sulla pressione arteriosa siano probabilmente simili [Copley 1998].

Riguardo all'insorgenza di diabete mellito de novo, gli inibitori della calcineurina agiscono direttamente a livello della cellula beta pancreatica: il tacrolimus e la ciclosporina interferiscono sul metabolismo del calcio intracellulare nelle cellule beta pancreatiche riducendo la secrezione di insulina. Il tacrolimus sembra esercitare un'azione diabetogena superiore a quella della ciclosporina: a distanza di un anno dal trapianto di rene l'incidenza di diabete è pari al 23% nei pazienti trattati con tacrolimus e al 14% nei pazienti trattati con ciclosporina.

Anche l'impiego di globuline policlonali antilinfocitarie rappresenta una condizione di rischio per lo sviluppo di patologia cardiovascolare, presumibilmente in ragione della severa e persistente CD4-linfopenia indotta da tali farmaci [Ducloux 1998].

La rapamicina, al contrario, è in grado di svolgere un'azione anti-aterosclerotica attraverso la riduzione dell'iperplasia neointimale, come dimostrato nei modelli sperimentali e dai risultati clinici ottenuti con stent medicati con sirolimus. Inoltre tale farmaco non determina alcun effetto ipertensivante [Johnson 2001]. Tuttavia la rapamicina esso agisce negativamente sul metabolismo lipidico aumentando in particolare i livelli di trigliceridi ematici [Mulay 2006].

L'unico farmaco immunosoppressivo del tutto privo di azione ipertensivante o dismetabolica è il micofenolato mofetile. Analogamente alla rapamicina, anche per il micofenolato sono stati evidenziati effetti anti-aterosclerotici in modelli sperimentali [Romero 2000, Ilkay 2006].

#### **1.3.4. Anemia**

Recentemente alcuni autori hanno analizzato il possibile dell'anemia quale fattore di rischio cardiovascolare nel trapianto renale [Sarnak 2002, Campise 2003]. Sulla base di tali osservazioni l'anemia rappresenterebbe da una parte una condizione di comorbidità cardiovascolare nei primi mesi dopo trapianto ed in particolare nei pazienti diabetici, dall'altra un fattore indipendente di rischio per la comparsa de novo di scompenso cardiaco.

Fin dagli esordi dell'insufficienza renale, l'anemia è un importante fattore di rischio cardiovascolare, in quanto sembra favorire lo sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra [Levin 2002]. Kirkpantur *et al.* hanno riportato che la correzione dell'anemia nei pazienti non ancora in trattamento dialitico può far regredire alcune delle alterazioni morfologico-funzionali cardiache comunemente osservate in questi soggetti [Kirkpantur 2005].

La prevalenza dell'anemia nei trapiantati di rene non è ben documentata, ma secondo la maggior parte degli autori essa è elevata nelle fasi precoci post-trapianto e più tardivamente particolarmente ove intervenga la disfunzione cronica dell'organo. Un lavoro di Miles *et al.*, in cui si utilizzava il parametro di un ematocrito inferiore al 33% per definire la

presenza dello stato anemico, ha riportato una prevalenza di questa complicanza del 12% dei pazienti portatori di trapianto renale [Miles 1997].

Le cause di anemia nei trapiantati renali sono molteplici: la terapia immunosoppressiva, in particolare gli antiproliferativi e la rapamicina, possono causare una riduzione della eritropoiesi soprattutto nelle prime settimane post-trapianto quando la produzione della eritropoietina non è ancora normalizzata o quando, più tardivamente, intervenga una ridotta funzione renale. Anche gli ACE-inibitori e gli antagonisti recettoriali dell'angiotensina II sembrano determinare una riduzione dell'eritropoiesi nei trapiantati renali [Montanaro 2001].

### ***1.3.5. Nefropatia Cronica da Trapianto***

Studi osservazionali suggeriscono che la nefropatia cronica da trapianto può rappresentare un fattore di rischio cardiovascolare nei trapiantati renali [Meier-Kriesche 2003]. Anche se i meccanismi non sono stati ancora completamente chiariti, sembra che il deterioramento funzionale del graft e la proteinuria, spesso presenti nella nefropatia cronica del trapianto, possano amplificare l'effetto negativo di altri fattori di rischio come l'ipertensione e la dislipidemia. È stato osservato come anche una modesta perdita di funzione renale (stimata con il calcolo della clearance della creatinina endogena) sia fortemente predittiva di eventi e mortalità cardiovascolare: a parità di altri fattori di rischio, un paziente con una clearance della creatinina inferiore a 60 mL/min ha un rischio di morte cardiovascolare circa doppio rispetto alla popolazione generale di controllo [Ruilope 2001]. È stato proposto che in questa associazione tra riduzione del filtrato glomerulare e complicanze cardiovascolari abbiano un ruolo anche alcuni fattori di rischio emergenti come l'iperomocisteinemia, lo stress ossidativo, lo stato infiammatorio cronico, l'anemia, le alterazioni del metabolismo calcio-fosforo. Nei trapiantati renali con disfunzione cronica del graft, inoltre, l'aumentata mortalità cardiovascolare si associa a fattori che sono di riconosciuto rischio

per la nefropatia cronica del trapianto, quali rigetto acuto, ritardata ripresa funzionale, età avanzata del donatore, numero di mismatches HLA, causa di morte del donatore, tempo prolungato di ischemia fredda [Briggs 2001].

### ***1.3.6. Alterazioni della coagulazione***

Diversi report hanno evidenziato come nella popolazione generale le anomalie della coagulazione in senso trombofilico costituiscano un fattore di rischio per MCV [Frishman 1998].

Dopo trapianto renale si verificano alterazioni quantitative di alcuni fattori della coagulazione, come il fibrinogeno, il fattore VII e il fattore di von Willebrand, favorendo uno stato protrombotico [Irish 2004]. Il PAI-1 è l'inibitore specifico del sistema fibrinolitico e un suo aumento nel sangue si associa ad elevato rischio cardiovascolare. Una ridotta fibrinolisi ed alti livelli di PAI-I, fibrinogeno e t-PA (tissue plasminogen activator) sono frequentemente riscontrati nei pazienti con trapianto renale e la terapia immunosoppressiva può svolgere un ruolo causale in queste alterazioni, in particolare, la ciclosporina e gli steroidi [Verpooten 1996, Sartori 2003]. Inoltre, sia gli inibitori della calcineurina che la rapamicina incrementano l'aggregazione piastrinica [Fernandes 1993, Babinska 1998].

### ***1.3.7. Stress ossidativo***

Lo stress ossidativo è la modificazione del normale equilibrio intracellulare tra sostanze ossidanti, prodotte fisiologicamente durante i processi metabolici e il sistema di difesa antiossidante che svolge la funzione di neutralizzarle. Diversi fenomeni fisiologici e patologici come l'infiammazione, le infezioni, la carcinogenesi, la senescenza, i processi di riparazione cellulare, le radiazioni, possono da una parte favorire la produzione di radicali liberi, ovvero specie reattive dell'ossigeno (ROS), dall'altra compromettere la capacità antiossidante totale dell'organismo. Quando la barriera antiossidante non è più sufficiente per controllare la quota



di radicali liberi generati, si verifica un'aumentata perossidazione dei lipidi, meccanismo chiave nelle complicanze aterosclerotiche cardiovascolari.

Al momento vi sono poche evidenze sull'impatto dello stress ossidativo come causa di danno cardiovascolare dopo trapianto renale [El-Ghar 2006]. Esistono molteplici fattori in grado di influenzare lo "stato ossidativo" di questi pazienti. Un aspetto importante in questo contesto è rappresentato dall'anemia, dal momento che i globuli rossi sono un importante sistema antiossidante ed è pertanto possibile ipotizzare che, nei pazienti trapiantati, uno stato anemico prolungato possa portare ad un disequilibrio tra stress ossidativo e barriera antiossidante, favorendo quindi la progressione del danno cardiovascolare [Dhalla 1996].

### ***1.3.8. Apoptosi***

Da diverso tempo è stato ipotizzato un coinvolgimento dell'apoptosi nello sviluppo delle lesioni aterosclerotiche [Best 1999]. Alcuni studi condotti sia sugli umani che sugli animali hanno evidenziato come le cellule muscolari lisce localizzate nella porzione fibrotica della placca e i macrofagi nell'intima mostrino un aumento dell'apoptosi rispetto ai vasi normali. Nel tessuto aterosclerotico, l'apoptosi è anche associata con la formazione di vescicole di matrice ricche in calcio ed è plausibile che tale processo possa giocare un ruolo nella calcificazione della placca [Hegy 2001].

Attualmente, non ci sono studi in letteratura sulla relazione intercorrente tra apoptosi, MCV e trapianto renale, mentre alcuni lavori sono focalizzati sul trapianto cardiaco [Miller 2001].

Nonostante i pochi dati disponibili, è però verosimile che l'apoptosi possa avere importanti implicazioni anche sulle complicanze del trapianto renale, come il rigetto acuto [Li 2001, Muthukumar 2003], la disfunzione cronica del graft [Ott 2002] e probabilmente la patologia cardiovascolare.

#### **1.4. Fattori genetici**

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha attribuito una crescente attenzione ai fattori genetici potenzialmente correlati alla suscettibilità individuale dei pazienti verso lo sviluppo di diverse patologie multifattoriali, inclusa la malattia cardiovascolare. Anche nella popolazione generale, infatti, la presenza di famiglie con un numero elevato di familiari affetti da MCV ha fatto nascere l'ipotesi di un'importante componente genetica.

Dalla presenza di i polimorfismi (Single Nucleotide Polimorphisms, SNPs), ovvero piccole variazioni all'interno del genoma, possono dipendere caratteristiche quali la propensione a soffrire di determinate patologie, o la tipologia della risposta ad un dato trattamento terapeutico.

I polimorfismi non rappresentano, come nel caso delle patologie monogeniche, la causa della malattia, ma la loro presenza ne può influenzare, aumentandolo o riducendolo, il rischio [Misefari 2001]. Tali variazioni genetiche hanno permesso di identificare associazioni dirette tra la presenza di un determinato allele in loci genici specifici ed il rischio di MCV, sia nella popolazione generale che nei trapiantati renali.

Un polimorfismo è definito come “il riscontro in una popolazione di due o più fenotipi geneticamente determinati, con una frequenza tale che il più raro non potrebbe essere mantenuto nella popolazione dalla sola mutazione spontanea, deve quindi avere una frequenza maggiore dell'1%”. I polimorfismi possono essere localizzati sia su regioni codificanti, sia su regioni non codificanti quali introni, promotori, 3'UTR.

In genere, i polimorfismi sulla regione codificante determinano sostituzioni aminoacidiche nella proteina sintetizzata, che ne possono alterare l'attività o l'interazione con altre molecole.

I cambiamenti nucleotidici della regione del promotore solitamente modificano la capacità di legame dei fattori di trascrizione e portano ad una variazione nell'espressione dei geni, definendo nella popolazione generale i cosiddetti “genotipi alti, medi e bassi produttori”, come è stato documentato per molte citochine [Sankaran 1999, Cartwright 2001].

Infine, dai polimorfismi localizzati in altre parti non codificanti dei geni, come introni o 3' UTR (3' Untranslated Region), possono dipendere difetti nel processamento degli RNA messaggeri o nella loro stabilità.

Nel caso del trapianto d'organo è quindi ipotizzabile che le variazioni interindividuali nel decorso clinico dei diversi pazienti possano essere in parte spiegate dalla presenza di varianti genetiche responsabili della produzione e della funzione di molecole con un ruolo chiave nelle possibili complicanze post-trapianto.

Nel trapiantato come nella popolazione generale, dunque, la progressione dei processi aterosclerotici è un fenomeno complesso e ancora non del tutto chiarito che vede verosimilmente coinvolti una serie di mediatori molecolari della risposta infiammatoria e dei processi riparativi: citochine, enzimi, molecole di adesione, fattori di crescita, effettori di apoptosi. L'entità specifica dell'attività biologica di questi importanti mediatori è geneticamente controllata, in quanto spesso correlabile alla presenza di polimorfismi, e potrebbe influire sulla suscettibilità individuale alla MCV dopo trapianto.

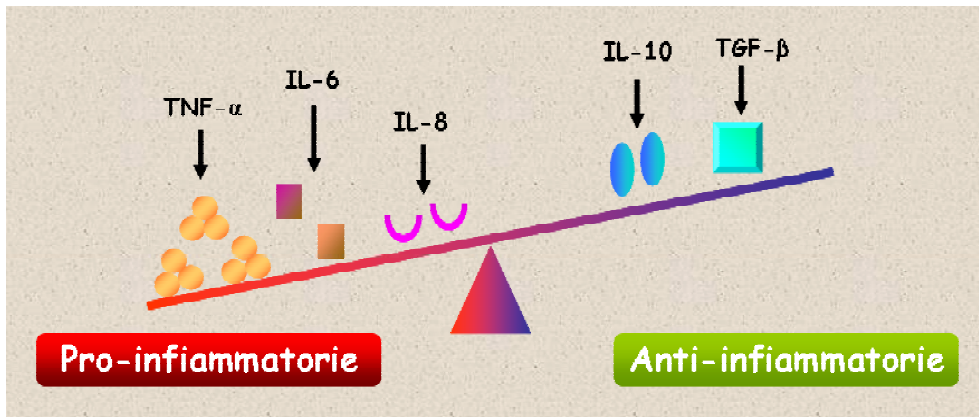
#### ***1.4.1. Polimorfismi di geni coinvolti nei processi d'infiammazione***

L'associazione tra infiammazione, aterosclerosi ed MCV è particolarmente forte nei pazienti uremici e nei trapiantati renali. Tra i meccanismi che possono facilitare l'instaurarsi di uno stato pro-infiammatorio, vi potrebbe essere un disequilibrio tra fattori pro e anti-flogistici in individui geneticamente predisposti. Tra i principali mediatori biochimici dell'infiammazione vi sono le citochine, molecole di natura glicoproteica di piccole dimensioni prodotte da diversi tipi cellulari, tra cui linfociti T, linfociti B e macrofagi.

L'interesse verso i polimorfismi citochinici è legato al fatto che molti di questi determinano i livelli di produzione di tali molecole sia in vitro che in vivo. Conseguentemente è verosimile che l'entità delle risposte infiammatorie nei diversi individui sia in qualche modo modulata dal loro assetto genetico,

potenzialmente in grado di influenzare la bilancia tra i livelli di citochine pro-infiammatorie ed anti-infiammatorie (Figura 5).

Studi di numerosità limitata fanno intravedere prospettive future in relazione a polimorfismi genici di alcune citochine (IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) nella modulazione del rischio cardiovascolare dopo trapianto renale [Altun 2005].



**Figura 5.** La bilancia tra le citochine pro-infiammatorie ed anti-infiammatorie.

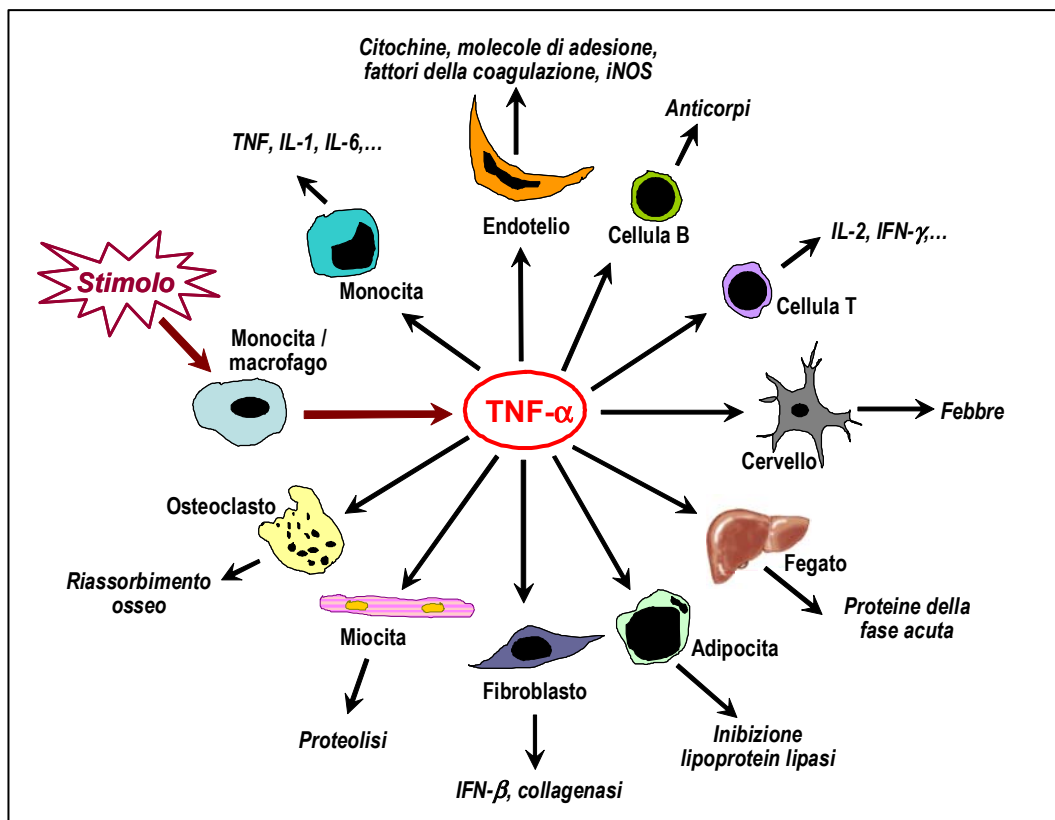
#### 1.4.1.1. Tumor Necrosis Factor alpha

Il Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- $\alpha$ ) è il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta a batteri e altri agenti infettivi ed è anche responsabile di molte manifestazioni sistemiche che complicano le infezioni.

La funzione biologica del TNF- $\alpha$  è quella di favorire il reclutamento di neutrofili e monociti nei focolai d'infezione, attivandone le funzioni microbicide. Il TNF- $\alpha$  media questi effetti agendo sia a livello delle cellule endoteliali della vascolatura che dei leucociti. Nelle cellule endoteliali induce l'espressione di molecole di adesione e le stimola unitamente ai macrofagi a secernere chemochine in grado di indurre la migrazione e il reclutamento dei leucociti. Agisce anche su fagociti mononucleati, inducendo la secrezione di IL-1. Oltre al ruolo svolto nell'ambito dell'infiammazione, il TNF- $\alpha$  può innescare il meccanismo apoptotico in alcuni tipi cellulari. Se lo stimolo per la produzione di TNF- $\alpha$  è sufficientemente forte la citochina è prodotta in

quantità così alte da entrare in circolo e svolgere un'azione endocrina provocando alterazioni anatomo-patologiche e cliniche sistemiche (Figura 6) [Abbas 2002].

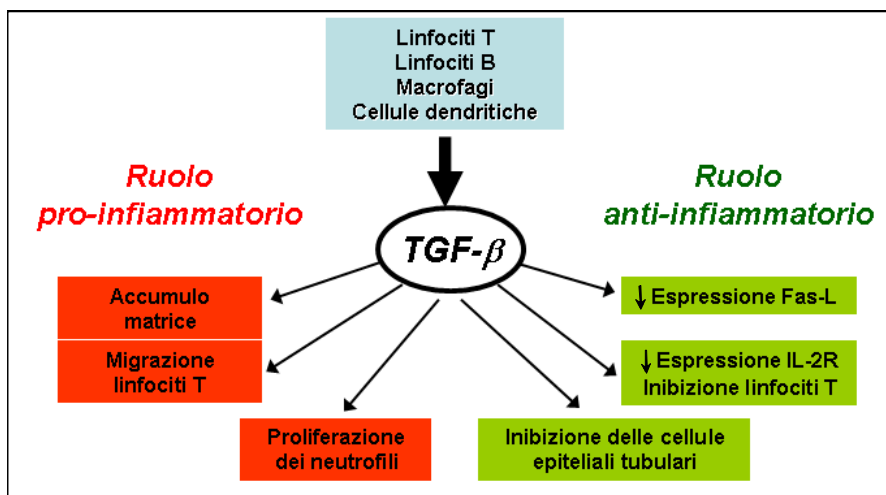
Il polimorfismo G-308A localizzato nella regione del promotore del gene del TNF- $\alpha$  è stato associato ad un aumento della trascrizione [Wilson 1997] e dei livelli di produzione proteica in vitro di 6-7 volte [Bouma 1996]. Il significato di questa differenza di espressione sull'esito del trapianto resta sconosciuto: tra i pochi studi disponibili, alcuni hanno riportato un'associazione con il rigetto del rene [Hanh 2001, Sankaran 1999], altri non hanno evidenziato alcun effetto [Hutchings 2002, Marshall 2000, Muller-Steinhardt 2002].



**Figura 6.** Attività biologiche del TNF- $\alpha$  [modificata da [www.medscape.com](http://www.medscape.com)].

#### 1.4.1.2. Transforming Growth Factor beta

Una delle molecole più studiate in relazione alle patologie renali e al trapianto, è il Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ ), citochina che può avere sia attività anti-infiammatoria che pro-infiammatoria (Figura 7).



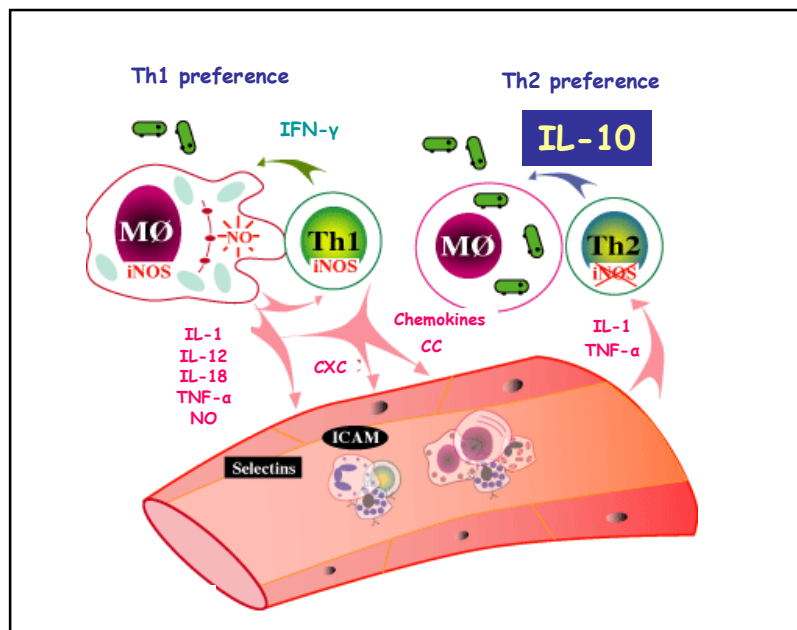
**Figura 7.** Attività biologiche del TGF- $\beta$ .

L'attività anti-infiammatoria del TGF- $\beta$  si esplica prevalentemente tramite downregolazione della catena  $\beta 2$  del recettore di IL-2. Le cellule che subiscono questa downregolazione sono incapaci di proliferare e attivarsi, riducendo così il processo infiammatorio. Il TGF- $\beta$  inoltre diminuisce l'espressione di Fas-L, una delle molecole coinvolte nell'induzione dell'apoptosi e contribuisce in questo modo a modulare la risposta infiammatoria [Luoviksson 2001].

La produzione individuale di tale mediatore infiammatorio sembra essere legata alla presenza di due polimorfismi nella regione codificante del gene, L10P ed R25P: in vitro, la presenza della leucina e dell'arginina, rispettivamente, determinano una maggiore produzione della citochina. Seppure sia stato ampiamente dimostrato come i polimorfismi L10P ed R25P siano correlati ai livelli di TGF- $\beta$  sia in vivo che in vitro, non sono state ancora completamente chiarite le alterazioni funzionali e/o conformazionali che i polimorfismi generano sulla proteina prodotta e quali possano essere gli effetti di tali varianti sulla suscettibilità individuale alla MCV dopo trapianto renale.

### 1.4.1.3. Interleuchina 10

L'Interleuchina 10 (IL-10) è un'importante citochina immunoregolatoria, tipicamente considerata anti-flogistica, coinvolta nel controllo omeostatico delle risposte innate e dell'immunità cellulo-mediata. Gli effetti biologici dell'IL-10 dipendono dalla sua capacità di limitare molte funzioni dei macrofagi attivati, facendo tornare il sistema immunitario allo stato di quiescenza. In particolare inibisce la produzione di IL-12 e TNF- $\alpha$ , l'espressione di costimolatori e di molecole MHC di classe II. Tramite quest'ultima azione, l'IL-10 blocca l'attivazione dei linfociti T e pone fine alle reazioni cellulo-mediate (Figura 8) [Abbas 2002].



**Figura 8.** Attività biologiche dell'IL-10.

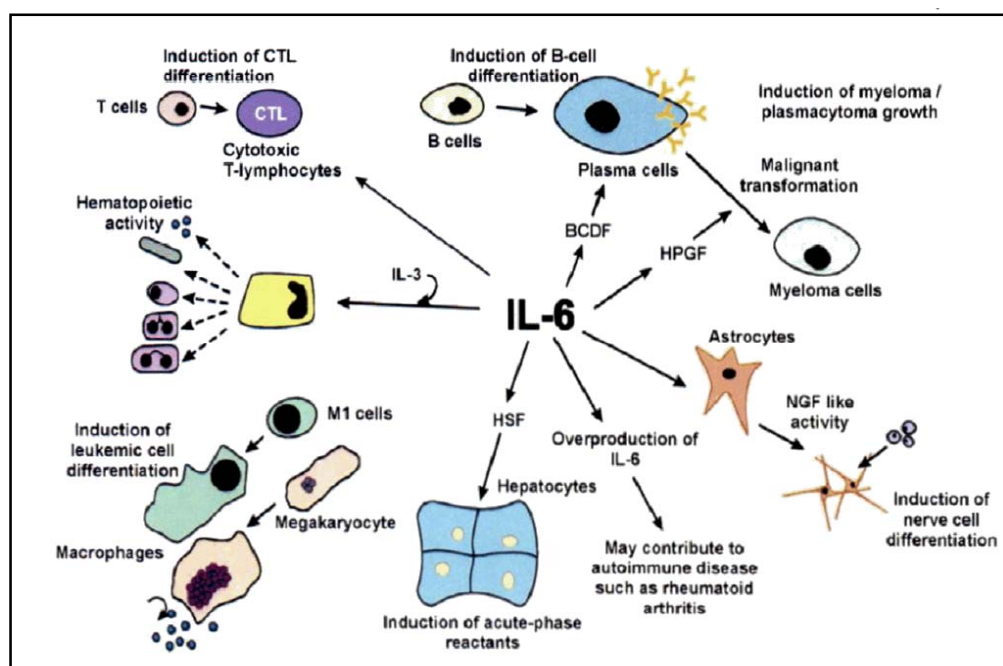
Per IL-10 è stato dimostrato che il livello individuale di produzione dipende dall'effetto sinergico dei tre SNPs del promotore: G-1082A, C-819T e C-592A; più precisamente, la presenza dell'aplotipo GCC determina livelli di secrezione alti o medi, a seconda che si trovi rispettivamente in omozigosi o eterozigosi, mentre tutti gli altri aplotipi sono associati a bassa produzione. Tali varianti genetiche hanno mostrato un ruolo predittivo sull'incidenza di rigetto acuto e nefropatia cronica da trapianto, anche se i lavori presenti in

letteratura sono spesso in disaccordo [Akalin 2001, Cartwright 2001, Asderakis 2001].

Riguardo all'influenza del genotipo di IL-10 sul rischio cardiovascolare dopo trapianto renale, l'unico studio al momento disponibile in letteratura è un lavoro di Altun *et al.* su una casistica limitata di 72 trapiantati, dal quale tuttavia non è emersa alcuna associazione significativa [Altun 2005].

#### 1.4.1.4. Interleuchina 6

L'Interleuchina 6 (IL-6) è una citochina coinvolta sia nell'ambito dell'immunità innata che di quella specifica. Essa è prodotta da fagociti mononucleati, cellule endoteliali, fibroblasti ed altri tipi cellulari in risposta a microbi o ad altre citochine (Figura 9).



**Figura 9.** Attività biologiche di IL-6 e cellule produttrici.

Sono stati identificati diversi polimorfismi situati nella regione 5' del gene di IL-6, ma la maggioranza degli studi sia in campo trapiantologico che in relazione ad altre patologie si sono focalizzati sulla sostituzione G->C in



posizione -174, dal momento che è quella che ha maggiore impatto sulla produzione in vivo della citochina.

In un lavoro di Marshall *et al.* del 2001, è stata dimostrata una correlazione tra il genotipo IL-6/G-174C del donatore e l'insorgenza e la severità di episodi di rigetto acuto indipendentemente dal HLA-DR matching [Marshall 2001]. Lo stesso polimorfismo, studiato nel ricevente, non ha evidenziato alcuna associazione con il rigetto acuto sia nello lavoro di Marshall, che in altri [Cartwright 2001, Hahn 2001].

Uno studio più recente di Müller-Steinhardt ha valutato il genotipo di IL-6 in relazione alla sopravvivenza a lungo termine del trapianto renale, evidenziando come i portatori dell'allele IL-6/G-174C presentino un aumentato rischio relativo di perdita del graft a tre anni [Müller-Steinhardt 2002].

Sull'impatto del genotipo di IL-6 sul rischio cardiovascolare dopo trapianto renale, al momento non vi sono dati.

#### 1.4.1.5. Interferon gamma

L'Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) è il più importante attivatore dei macrofagi, svolge un'azione centrale nelle risposte innate e nell'immunità cellulo-mediata specifica e rappresenta la citochina prototipica della sottopopolazione Th1.

Come per altre citochine, è stato dimostrato che i livelli di produzione di IFN- $\gamma$  sono sotto controllo genetico. Il primo polimorfismo descritto da Pravica *et al.* nel 1999 è una ripetizione CA di lunghezza variabile nell'introne 1 [Pravica 1999]. Successivamente lo stesso gruppo di ricercatori ha identificato un secondo polimorfismo, una sostituzione T→A in posizione +874, sempre nel primo introne, localizzato all'estremità 5' rispetto al microsatellite ed in completo *linkage disequilibrium* con questo: sembra che la presenza dell'allele T introduca nella sequenza un sito putativo di legame con

NF- $\kappa$ B, determinando un incremento dell'attività trascrizionale del gene [Pravica 2000].

In relazione al trapianto renale, non sono molti al momento gli studi di associazione con il genotipo di IFN- $\gamma$ . Un recente lavoro di Alakulppi, eseguito per individuare l'impatto sul rischio di rigetto acuto di diversi polimorfismi citochinici nel genoma del donatore o del ricevente, non ha evidenziato un ruolo predittivo del polimorfismo T+874A di IFN- $\gamma$  [Alakulppi 2004]. Al contrario, Hoffmann *et al.* hanno riportato come il genotipo alto produttore IFN- $\gamma$  (allele T) nel donatore rappresenti un fattore di rischio per lo sviluppo di nefropatia cronica del trapianto [Hoffmann 2004].

In considerazione del ruolo di tale mediatore molecolare nei meccanismi infiammatori, è ipotizzabile che il genotipo di IFN- $\gamma$  possa avere un'influenza anche nella MCV.

#### 1.4.1.6. Interleuchina 8

L'Interleuchina 8 (IL-8) è una chemochina prodotta da diversi tipi di cellule immunitarie, come i leucociti, e non immunitarie, quali cellule endoteliali, epiteliali e fibroblasti. La sua secrezione è stimolata anche da altre citochine, ad es. TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , e la principale azione si esplica soprattutto sui neutrofili durante i processi infiammatori, funzionando come un potente fattore chemiotattico e angiogenico, in quanto capace di promuovere la migrazione e la proliferazione di cellule endoteliali.

A carico del gene di IL-8 sono stati identificati 3 polimorfismi, due nell'introne 1 (T+396G e C+781T) ed uno sul promotore (T-251A); in relazione a quest'ultimo, la presenza dell'allele A è stato correlato a più alti livelli trascrizionali della chemochina [Hull 2001].

Al momento non ci sono studi in letteratura che correlino il genotipo di IL-8 al decorso del trapianto.

### ***1.4.2. Polimorfismi di geni coinvolti nell'apoptosi***

Nella sopravvivenza dei trapianti, l'apoptosi riveste un ruolo chiave sia perché è il mezzo attraverso cui vengono eliminate le cellule allogeniche, sia perché è un possibile meccanismo di induzione di tolleranza verso l'organo in quanto permette di modulare il sistema immunitario attraverso la rimozione di linfociti attivati [Ankersmit 2002, Gorak-Stolinska 2001, Watanabe 1997].

Alcuni studi recenti hanno inoltre fatto emergere un potenziale ruolo della morte cellulare programmata nella progressione delle lesioni aterosclerotiche [Best 1999]. In letteratura, tuttavia, sono ancora pochi i lavori che indagano l'effetto di varianti geniche in effettori di apoptosi rispetto all'outcome del trapianto di rene [Mullauer 2001].

#### ***1.4.2.1. Fas***

Il Fas è una proteina di superficie appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF-NGF. La via di trasduzione del segnale di apoptosi inizia con il legame tra Fas e Fas-L che avvia un meccanismo a cascata che termina con l'attivazione sequenziale della caspasi-8 e della caspasi-3 (Figura 10) [Krammer 2000, MacFarlane 2004].

Il polimorfismo G-670A localizzato nel promotore del gene Fas è quello più caratterizzato: la sostituzione di una A con una G elimina un putativo elemento di trascrizione nucleare GAS, modificando l'espressione del gene e quindi la suscettibilità dei linfociti T e delle cellule allogeniche dell'organo verso l'apoptosi Fas-mediata [Huang 1997].

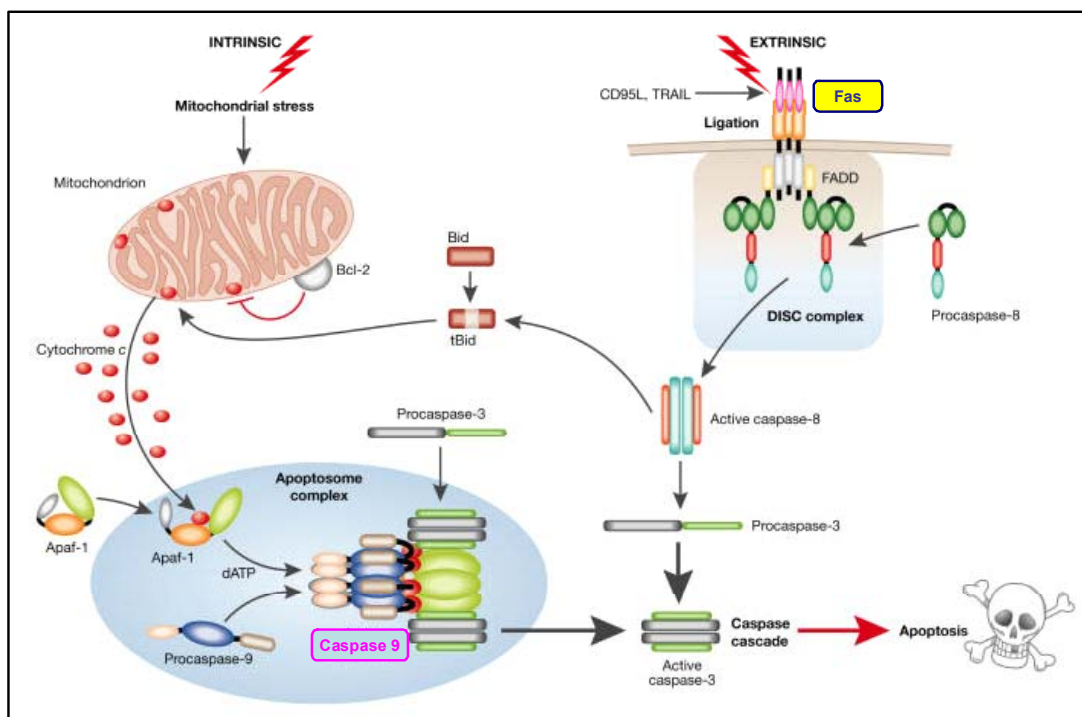
Due lavori successivi di Cappellesso *et al.* hanno analizzato il potenziale effetto del polimorfismo Fas/G-670A sul rischio di rigetto acuto: il genotipo basso produttore di Fas (-670GG) riscontrato nel genoma donatore sembra avere un ruolo protettivo sull'incidenza di episodi di rigetto acuto [Cappellesso 2004], mentre lo stesso polimorfismo nel ricevente non ha evidenziato alcuna associazione [Cappellesso 2002].

L'influenza del polimorfismo Fas/G-670A sulla suscettibilità alla MCV dopo trapianto renale non è stato ancora investigata.

#### 1.4.2.2. Caspasi 9

La Caspasi 9 è la molecola iniziatrice che innesca il pathway intrinseco dell'apoptosi, ovvero una cascata molecolare che si conclude con la degradazione del DNA ad opera di fattori nucleari fino alla morte della cellula (Figura 10) [Thornberry 1998, Abbas 2002]. Sebbene i polimorfismi a carico di geni delle caspasi siano stati finora poco studiati, un lavoro di Hirano *et al.* ha segnalato l'esistenza di una variante del gene della Caspasi 9 (Casp9) che determina una sostituzione aminoacidica al codon 221 di una glutamina con un arginina [Hirano 2001].

Ipotizzando che tale polimorfismo possa incidere sull'induzione di apoptosi, nel presente lavoro si è indagato il suo potenziale impatto sul rischio cardiovascolare dopo trapianto di rene.



**Figura 10.** Le vie d'induzione dell'apoptosi [da MacFarlane 2004].

## 2. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo primario di questo studio è stato l'individuazione di profili genetici a maggior (o minor) rischio di MCV mediante l'analisi di polimorfismi correlati ai processi di infiammazione e apoptosi (Tabella 4) in una popolazione di trapiantati di rene.

In un prossimo futuro, l'impiego di tali marcatori genetici nella pratica clinica potrà consentire da una parte di identificare i pazienti portatori di un particolare genotipo "di rischio" che siano da sottoporre a profilassi primaria più mirata ed efficace, dall'altra di trattare soggetti già portatori della protezione genetica *naturale* con schemi terapeutici meno "aggressivi".

	Geni	SNPs	Localizzazione nel gene			
			Promotore	Esone	Introne	3' UTR
Infiammazione	TNF- $\alpha$	G-308A	◆			
	TGF- $\beta$	L10P		◆		
		R25P		◆		
	IL-10	G-1082A	◆			
		C-819T	◆			
		C-592A	◆			
	IL-6	G-174C	◆			
	IFN- $\gamma$	T+874A			◆	
IL-8	T-251A	◆				
Apoptosi	Fas	G-670A	◆			
	Casp9	R221Q		◆		

**Tabella 4.** Polimorfismi analizzati nello studio e loro localizzazione all'interno del gene.

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Pazienti

Nello studio sono stati inclusi 167 pazienti trapiantati di rene presso l'U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico Universitario S. Orsola di Bologna dal 1997 al 2005 (follow-up minimo di 12 mesi).

I criteri di esclusione erano i seguenti: razza non caucasica, età inferiore ai 18 anni, gravidanza, diabete o intolleranza glucidica, gravi patologie (neoplasie maligne o altre patologie a prognosi infausta a breve termine), sepsi, primary non function.

I pazienti sono stati arruolati nello studio previa sottoscrizione di un consenso informato scritto a partecipare allo studio.

Le caratteristiche demografiche e cliniche della popolazione in studio sono riportate nella Tabella 5.

Nella prima parte della ricerca, l'impatto dei diversi polimorfismi genetici sul rischio cardiovascolare è stato valutato con uno studio epidemiologico di tipo caso-controllo. I pazienti sono stati suddivisi in due gruppi per confronto delle distribuzioni dei genotipi: trapiantati renali andati incontro ad un evento cardiovascolare (infarto del miocardio, cardiopatia ischemica, scompenso cardiaco congestizio, ipertrofia ventricolare sinistra, ictus ischemico, arteriopatie dei tronchi sopraaortici, arteriopatia obliterante degli arti inferiori) dopo trapianto (Gruppo MCV, n=35) e pazienti senza complicanze cardiovascolari dopo trapianto (Gruppo no MCV, n=132).

Nella fase successiva dell'indagine, la popolazione in studio è stata suddivisa in base ai genotipi per ciascun polimorfismo e, nell'ambito di tali "categorie genotipiche", sono stati comparati i livelli sierici di alcuni marker biochimici correlati al danno cardiovascolare: omocisteina, Lp(a), proteina C reattiva (CRP), fibrinogeno, colesterolo LDL, attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), soluble

vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble P-selectin (sP-selectin) e soluble CD40 ligand (sCD40L).

Sesso	M: 88; F: 49
Età del ricevente (anni)	42,5 ± 12,9
Età del donatore (anni)	42,4 ± 16,9
Età dialitica (mesi)	30,3 ± 26,7
Nefropatia di base	
– Glomerulonefrite	48/167
– Rene policistico	21/167
– Nefropatia da IgA	19/167
– Nefrite interstiziale	15/167
– Nefropatia vascolare	9/167
– Nefropatia ereditaria	7/167
– Non diagnosticata	18/167
Terapia	
– Steroidi	115/167
– Ciclosporina	64/167
– Azatioprina	35/167
– MMF/Myfortic	46/167
– Tacrolimus	55/167
– Sirolimus/Everolimus	4/167
Tempo di ischemia fredda (ore)	16,6 ± 0,5
Mismatches HLA-A	1,2 ± 0,7
Mismatches HLA-B	1,3 ± 0,6
Mismatches HLA-DR	0,8 ± 0,6
Delayed graft function (giorni)	3,9 ± 5,4
Creatinina alla dimissione (mg/dL)	1,6 ± 0,5
Creatinina a 1 anno (mg/dL)	1,4 ± 0,4
Creatinina a 2 anni (mg/dL)	1,6 ± 0,5
Creatinina a 3 anni (mg/dL)	1,6 ± 0,6
Creatinina a 4 anni (mg/dL)	1,7 ± 0,7

**Tabella 5.** Principali caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti in studio.

### **3.2. Raccolta e stoccaggio dei campioni biologici**

A ciascun paziente reclutato nello studio, sono stati prelevati 15-20 mL di sangue, distribuiti in due provette, una per il siero destinato agli esami di chimica clinica e per il dosaggio dei marcatori di rischio cardiovascolare in citofluorimetria, una contenente K<sub>3</sub>EDTA per l'estrazione del DNA.

I campioni di siero e di DNA genomico sono stati conservati a -20°C.

### **3.3. Estrazione di DNA genomico**

Il DNA genomico è stato estratto da 5 mL di sangue periferico K<sub>3</sub>EDTA mediante il kit GenomicPrep™ Blood DNA Isolation Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), progettato per isolare DNA dalle cellule nucleate del sangue.

Il protocollo è stato eseguito in triplicato su aliquote di sangue da 300 µL. Il primo passaggio consiste nella lisi dei globuli rossi: a ciascuna aliquota da 300 µL di sangue intero sono stati aggiunti 900 µL di soluzione di lisi (RBC) e si è proceduto ad un'incubazione a temperatura ambiente 10 minuti. Dopo una centrifugazione di un minuto a 13000-16000 g, è stato eliminato il sovrantante, lasciando il pellet in 10-20 µL di liquido residuo nel quale è stato poi risospeso. Mediante l'aggiunta di 300 µL di un detergente anionico (soluzione di lisi) che solubilizza i componenti cellulari, le cellule bianche sono state lisate in presenza di un agente DNA-protettivo; quest'ultimo limita l'attività delle DNasi presenti sia nella cellula che nell'ambiente. Successivamente, per rimuovere contaminanti di RNA, è stato effettuato un trattamento 1,5 µL con RNasi (a 37°C per 15 minuti). Nella fase seguente, sono state eliminate le proteine citoplasmatiche e nucleari con l'aggiunta di 100 µL di soluzione di precipitazione. Dopo centrifugazione, le proteine sotto forma di un denso pellet sono state scartate ed il DNA genomico presente nel sovrantante è stato isolato per precipitazione con l'aggiunta di 300 µL di alcool isopropilico al 100%. Dopo due lavaggi consecutivi con 300 µL di etanolo al 70%, il pellet è stato essiccato all'aria per 10-15 minuti. Successivamente, il campione è stato reidratato con 100 µL di acqua distillata



sterile (H<sub>2</sub>O RNase DNase free Ultra Pure, Invitrogen life technologies, Carlsbad, USA) overnight a temperatura ambiente. Da ciascuna aliquota di 300 µL di sangue è stata ottenuta una quantità di DNA genomico compresa tra 100 e 400 ng/µL.

La stima quantitativa del DNA isolato è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio. È stato preparato un gel alla concentrazione dello 0,8% in TBE. In ogni pozzetto sono stati caricati 1 µL di DNA estratto, 4 µL di acqua distillata sterile e 5 µL di loading buffer 2X (rosso cresolo 1 mg/mL, glicerolo 625 mg/mL). Per quantificare il DNA estratto è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA).

### **3.4. Analisi del genotipo**

Per lo studio dei diversi polimorfismi in esame sono state impiegate due diverse tecniche:

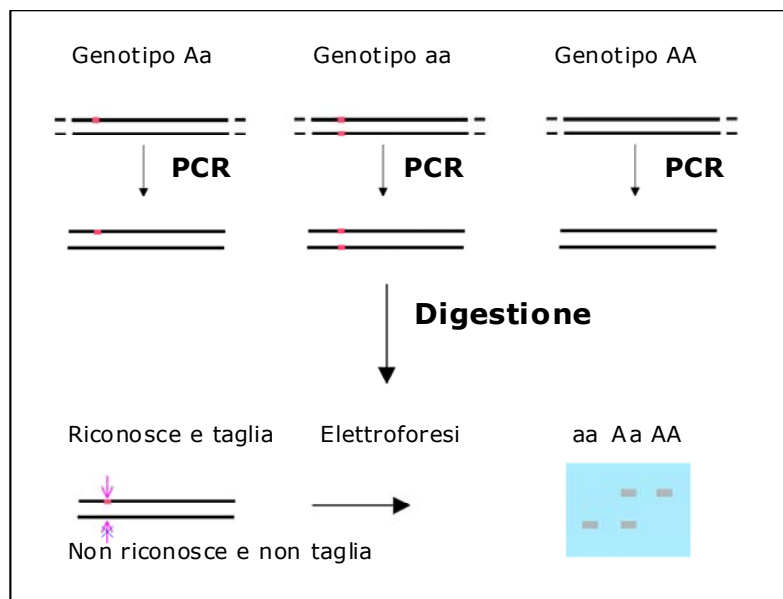
- la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), basata sulla combinazione di amplificazione di frammenti di DNA in PCR (Polymerase Chain Reaction) e successiva analisi di siti di restrizione per i polimorfismi di IL-8, Fas e Casp9;
- la Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (PCR-SSP), metodica di amplificazione allele-specifica per i polimorfismi di TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6 ed IFN- $\gamma$ .

#### ***3.4.1. Analisi RFLP per IL-8/T-251A, Fas/G-670A e Casp9/R221Q***

La tecnica RFLP si basa sulla capacità di particolari enzimi di origine batterica, detti “enzimi di restrizione”, di riconoscere una sequenza specifica sul DNA e tagliare il legame fosfodiesterico presente tra due nucleotidi. Un polimorfismo di restrizione è definito come uno SNP localizzato in una breve sequenza di DNA che viene riconosciuta e conseguentemente tagliata da uno specifico enzima di restrizione. Il cambiamento anche di una sola base

all'interno del sito di restrizione impedisce il riconoscimento della sequenza da parte dell'enzima che, quindi, non riesce ad agire in quella sequenza nucleotidica. L'enzima deve essere scelto in modo tale che il sito di riconoscimento venga riconosciuto e tagliato solo nel caso in cui contenga una certa sequenza, e non nucleotidi differenti. L'identificazione degli alleli può essere effettuata mediante una separazione elettroforetica su gel di agarosio in base alle dimensioni dei frammenti che vengono prodotti in seguito alla digestione.

La metodica quindi consiste in una digestione enzimatica di un frammento di DNA, precedentemente amplificato per PCR, all'interno della quale si trova il polimorfismo. Se l'individuo da genotipizzare è omozigote per uno SNP che elimina un sito di restrizione, l'enzima non sarà in grado di tagliare e sul gel si osserverà un'unica banda delle stesse dimensioni del frammento amplificato. Se l'individuo è omozigote per un allele che mantiene un sito di taglio, sul gel si osserveranno due bande che indicano che l'enzima ha tagliato. Se l'individuo è eterozigote, cioè portatore di entrambi gli alleli, si osserveranno tre bande, una delle dimensioni del frammento amplificato e due più piccole delle dimensioni dei frammenti in cui viene tagliato l'amplificato (Figura 11).



**Figura 11.** Principi dell'analisi RFLP.

Per eseguire l'analisi dei polimorfismi di IL-8, Fas e Casp9, la fase di progettazione dei primers (sintetizzati dalla ditta Invitrogen life technologies) è stata eseguita mediante il ricorso al programma *Primer 3*, disponibile al sito Web [http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3\\_www.cgi](http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi/primer3_www.cgi), facendo riferimento alle sequenze del database pubblico GenBank ([www.ncbi.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nih.gov/Genbank)), il cui numero di accesso è riportato nella Tabella 6.

La specificità delle sequenza è stata controllata sul sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/Blast.cgi>, la dinamica della reazione attraverso la simulazione della PCR utilizzando il programma *Amplify* per elaboratore *Apple Macintosh*, e la struttura secondaria dell'amplicone sul sito internet <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna>.

Le coppie di primers utilizzate per ogni gene e le rispettive caratteristiche sono riportate nella Tabella 6.

Gene	Genbank	Sequenza del primer (5' → 3')	Ta (°C)	Amplicone
<b>IL-8</b>	M28130	<i>U:</i> atgatagcatctgtaattaac <i>L:</i> gagtatgacgaaagtttcttt	54 58	238 bp
<b>Fas</b>	HSFASX1	<i>U:</i> gtaataacagagatgccctat <i>L:</i> aataaccctttgcttagccca	58 60	322 bp
<b>Casp9</b>	NM_001229	<i>U:</i> gcctggagtcttagtggcta <i>L:</i> atcgaggacatccaggtgcgc	64 66	173 bp

**Tabella 6.** Schema riassuntivo dei primers utilizzati con i relativi numeri di accesso Genbank, le sequenze oligonucleotidiche, le temperature di annealing (Ta) e le dimensioni dell'amplicone.

Tutti i campioni sono stati amplificati con il termociclatore Gene Amp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA).

Le amplificazioni, allestite in volumi di reazione di 25 µL, sono state eseguite utilizzando l'enzima Ampli Taq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems). Le miscele di reazione sono descritte in dettaglio di seguito:

*IL-8/T-251A*

- ◆ 2,5 µL di Buffer 10x per una concentrazione finale 1x;
- ◆ 0,2 mM di dNTPs;
- ◆ 6,25 pmol di ciascun primer;
- ◆ 0,5 U di Ampli Taq Gold DNA Polymerase;
- ◆ 3,0 mM di MgCl<sub>2</sub>;
- ◆ 150 ng di DNA genomico;
- ◆ acqua distillata RNase DNase free ad un volume finale di 25 µL.

*Fas/G-670A*

- ◆ 2,5 µL di Buffer 10x per una concentrazione finale 1x;
- ◆ 0,2 mM di dNTPs;
- ◆ 6,25 pmol di ciascun primer;
- ◆ 0,5 U di Ampli Taq Gold DNA Polymerase;
- ◆ 3,5 mM di MgCl<sub>2</sub>;
- ◆ 150 ng di DNA genomico;
- ◆ acqua distillata RNase DNase free ad un volume finale di 25 µL.

*Casp9/R221Q*

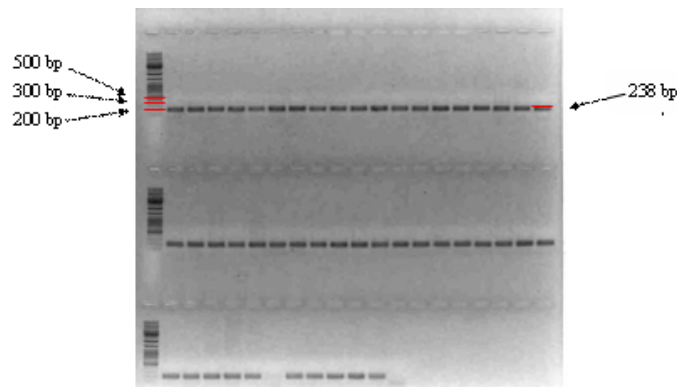
- ◆ 2,5 µL di Buffer 10x per una concentrazione finale 1x;
- ◆ 0,2 mM di dNTPs;
- ◆ 7,5 pmol di ciascun primer;
- ◆ 0,5 U di Ampli Taq Gold DNA Polymerase;
- ◆ 3,5 mM di MgCl<sub>2</sub>;
- ◆ 150 ng di DNA genomico;
- ◆ acqua distillata RNase DNase free ad un volume finale di 25 µL.

Per la reazione di amplificazione sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

1. Denaturazione iniziale dei templati a 94°C per 9 minuti.
2. Denaturazione degli stampi a 94°C per 30 secondi.

3. Annealing dei primers alla Ta (60°C per Fas, 56°C per IL-8 e 64°C per Casp9) per 30 secondi.
4. Estensione a 72°C per 30 secondi.  
Le fasi 2, 3 e 4 vengono ripetute per un totale di 40 cicli.
5. Estensione finale a 72°C per 10 minuti.
6. Blocco della reazione a 4°C.

I risultati delle reazioni di PCR sono stati verificati caricando 5 µL di amplificato (+5 µL di loading buffer 2X) su gel di agarosio all'1,5% in presenza del marcatore di peso molecolare GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas International Inc, Burlington, Canada) (Figura 12).



**Figura 12.** Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di PCR di IL-8.

Successivamente aliquote degli amplificati sono state sottoposte a digestione con l'opportuno enzima di restrizione per l'identificazione del genotipo. Gli enzimi di restrizione sono stati scelti sulla base delle sequenze contenenti lo SNP ricorrendo ad un software accessibile sul Web all'indirizzo <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>.

Nel caso del polimorfismo IL-8/T-251A, è stato utilizzato *Mun I* (New England BioLabs) clonato da *Mycoplasma species*; tale enzima funziona in condizioni ottimali a 37°C ed è inattivato a 65°C.

Il polimorfismo Fas/G-670A è stato analizzato ricorrendo l'enzima *BstN I* (New England BioLabs) clonato dal *Bacillus stearothermophilus*, che

ha una temperatura ottimale di reazione di 60°C e che non necessita di inattivazione al calore.

Infine, l'enzima impiegato per la tipizzazione del polimorfismo Casp9/R221Q è stato *Bsh1236 I* (Fermentas), clonato da *Bacillus Sphaericus RFL1236*, che ha un optimum di temperatura a 37°C e viene inattivato anch'esso a 65°C.

Il sito di restrizione di ogni enzima e le dimensioni dei frammenti sono riportate in Tabella 7.

Gene	Amplicone (bp)	Enzima di restrizione	Sito di restrizione	Frammenti (bp)
IL-8/T-251A	238	<i>Mun I</i>	5' ...C↓AATTG... 3' 3' ...GTTAA↑C... 5'	T 238 A 94 e 144
Fas/G-670A	222	<i>BstNI</i>	5' ...CC↓WGG... 3' 3' ...GGW↑CC... 5'	G 96 e 127 A 222
Casp9/R221Q	165	<i>Bsh1236 I</i>	5' ...CG↓CG... 3' 5' ...GC↑GC... 3'	A 61 e 112 G 173

**Tabella 7.** Schema riassuntivo degli enzimi utilizzati, con i relativi siti di restrizione e i frammenti generati.

I protocolli di digestione sono stati i seguenti:

#### *IL-8/T-251A*

- ◆ 2 µL di buffer G (10x) per una concentrazione finale di 1x;
- ◆ 0,5 µL di enzima *Mun I* (10.000 U/mL) per una concentrazione finale di 1 U/µL;
- ◆ 10 µL di prodotto di PCR;
- ◆ acqua distillata RNase DNase free ad un volume finale di 20 µL.

La reazione è fatta avvenire a 37°C per 2 ore, seguite da 20 minuti a 60°C per inattivare l'enzima.

### *Fas/G-670A*

- ◆ 2 µL di buffer 2 (10x) per una concentrazione finale di 1x;
- ◆ 0,2 µL di BSA (100x) per una concentrazione finale di 1x;
- ◆ 1 µL di enzima *BstNI* (10.000 U/mL) per una concentrazione finale di 0,5 U/µL;
- ◆ 10 µL di prodotto di PCR;
- ◆ acqua distillata RNase DNase free ad un volume finale di 20 µL.

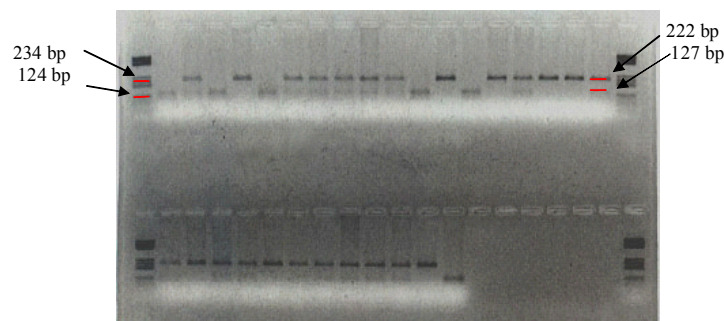
La reazione è stata avvenire a 60°C per 2 ore.

### *Casp9/R221Q*

- ◆ 1 µL di buffer R (10x) per una concentrazione finale di 1x;
- ◆ 1 µL di enzima *Bsh1236I* (10.000 U/mL) per una concentrazione finale di 1 U/µL;
- ◆ 5 µL di prodotto di PCR;
- ◆ acqua distillata RNase DNase free ad un volume finale di 10 µL.

La reazione è fatta avvenire a 37°C per 2 ore, seguite da 20 minuti a 60°C per inattivare l'enzima.

Tutti i prodotti di digestione sono stati caricati nei pozzetti di un gel di agarosio al 2,5% per identificare il genotipo di ciascun paziente in base al pattern delle bande generato dai frammenti digeriti (Figura 13).



**Figura 13.** Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di digestione del gene Fas.

### ***3.4.2. Analisi PCR-SSP per TNF- $\alpha$ /G-308A, TGF- $\beta$ /L10P, TGF- $\beta$ /R25P, IL-10/G-1082A, IL-10/C-819T, IL-10/C-592A, IL-6/G-174C e IFN- $\gamma$ /T+874A***

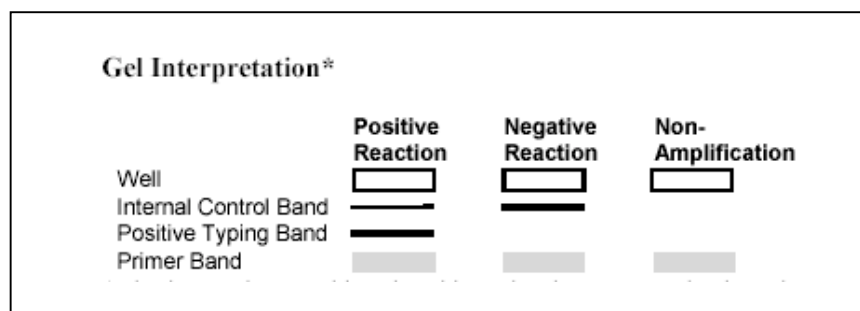
La metodica della PCR-SSP si basa sul principio che primers perfettamente corrispondenti alla sequenza bersaglio sono molto più efficienti nell'amplificazione da parte della Taq polimerasi rispetto a primers di oligonucleotidi che contengono mismatches. Le coppie di oligonucleotidi vengono quindi costruite in modo da essere completamente allineate ad un singolo allele o con un gruppo di alleli. In condizioni di PCR rigidamente controllate, tali coppie di primers consentono l'amplificazione di sequenze specifiche (risultato positivo) mentre coppie di primers non complementari non consentono alcuna amplificazione (risultato negativo). Una volta terminato il ciclo di PCR, i frammenti di DNA amplificati sono separati con elettroforesi su gel di agarosio al 2,5% e sono visualizzati tramite colorazione con etidio bromuro ed esposizione alla luce ultravioletta.

L'interpretazione dei risultati di una PCR-SSP è basata sulla presenza o assenza di uno specifico frammento di DNA amplificato (Figura 14).

Poiché la reazione di PCR può essere inficiata da diversi fattori (errori di pipettamento, DNA di scarsa qualità, presenza di inibitori, ecc.) viene aggiunta ad ogni reazione di PCR una coppia di primers di controllo interno. Questa coppia di primers amplifica per una regione altamente conservata del gene della  $\beta$ -globina umana, che è presente in tutti i campioni di DNA ed è usata per verificare l'avvenuta realizzazione di PCR.

Su gel di agarosio saranno visibili una o due bande per pozzetto: quella del gene di controllo (più in alto) e quella dell'allele presente o meno (più in basso). È possibile anche che la banda del controllo interno sia più debole come intensità o non visibile, a causa della differenza di concentrazione e delle temperature di melting fra i primers specifici per i polimorfismi e i primers del gene di controllo. Perciò, una reazione positiva per uno specifico allele di una citochina è visualizzato sul gel come frammento di DNA amplificato fra la banda del prodotto del controllo interno e la banda dei primers non incorporati (Figura 14).





**Figura 14.** Schema per l'interpretazione dei risultati della PCR-SSP.

I polimorfismi delle citochine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6 e IFN- $\gamma$  sono stati analizzati ricorrendo al kit Cytokine Genotyping Tray (One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA). La metodica viene eseguita su una piastra da 96 pozzetti in cui si trovano i primers sequenza-specifici liofilizzati per l'amplificazione dei vari frammenti di DNA contenenti i polimorfismi citochinici in esame, piú i primers l'amplificazione di controllo per il gene della  $\beta$ -globina. La procedura è consistita nell'allestire una miscela di reazione per ogni DNA da tipizzare, aggiungendo a 180  $\mu$ L di D-mix (contenente buffer e dNTPs), 19  $\mu$ L di DNA concentrato circa 100 ng/ $\mu$ L e 1  $\mu$ L (pari a 5 U) di AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems). Dopo aver aliquotato 10  $\mu$ L della mix nei relativi pozzetti, è stato eseguito il seguente profilo termico:

- Denaturazione iniziale a 96°C per 130 secondi e a 60°C per 60 secondi per separare i due filamenti di DNA genomico.
- Denaturazione a 96°C per 10 secondi per dividere il DNA stampo a doppio filamento della  $\beta$ -globina nelle due molecole a singolo filamento.
- Annealing alla temperatura  $T_a=63^\circ\text{C}$  per 60 secondi affinché i primers di quest'ultima si leghino alla loro sequenza complementare sui due filamenti stampo a singola elica e la polimerasi possa estendere.
- Le fasi 2 e 3 vengono ripetute per 9 cicli.

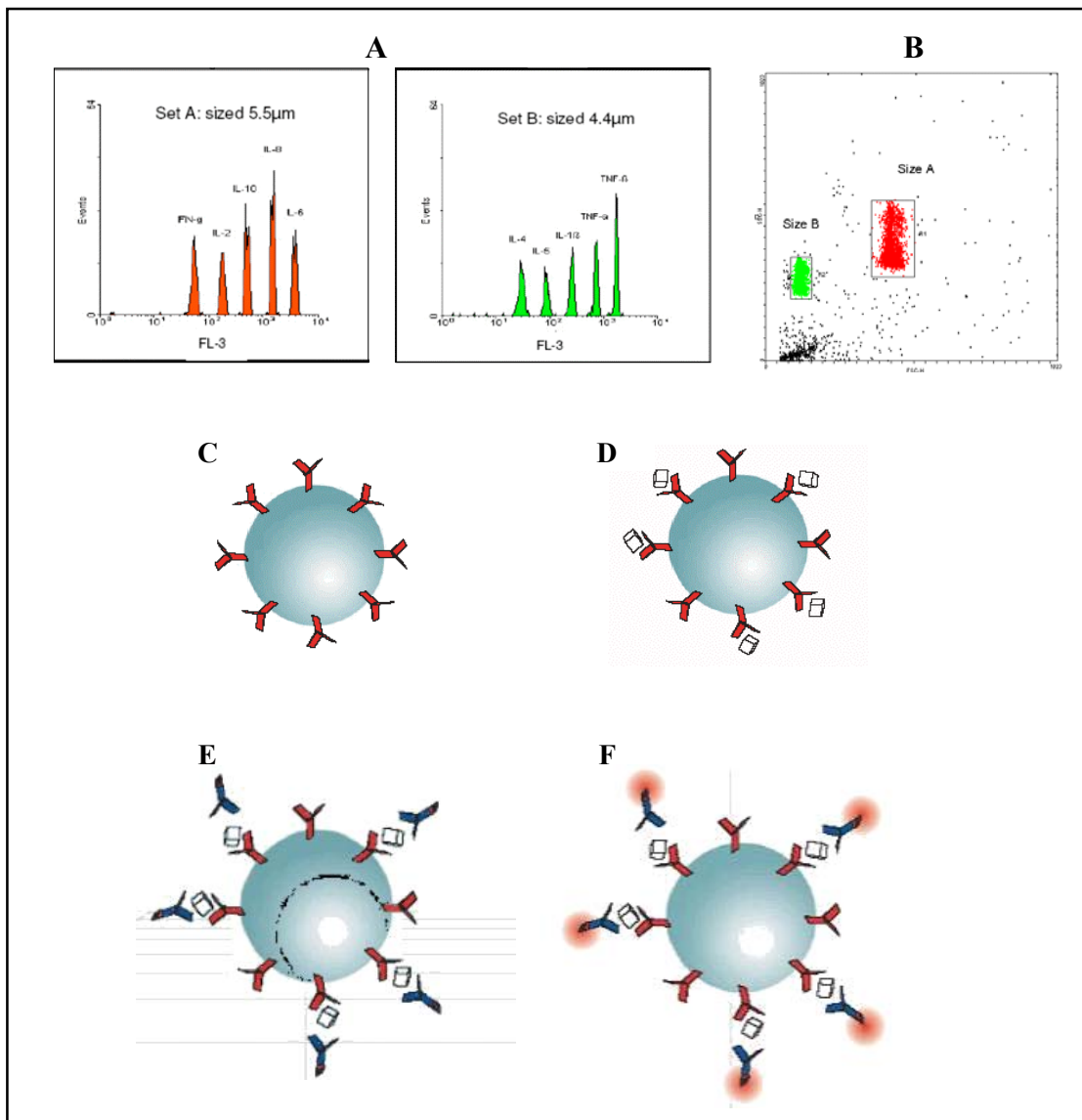
- Denaturazione a 96°C per 10 secondi per dividere il DNA stampo a doppio filamento degli alleli delle diverse citochine nelle due molecole a singolo filamento.
- Annealing alla temperatura  $T_a=59^\circ\text{C}$  per 60 secondi affinché i primers delle citochine si leghino alla loro sequenza complementare sui due filamenti stampo a singola elica.
- Estensione a 72°C per 30 secondi.
- Le fasi 5, 6 e 7 vengono ripetute per un totale di 20 cicli.
- Blocco della reazione a 4°C.

Per l'interpretazione dei risultati secondo lo schema previsto dalla metodica, ogni prodotto di PCR è stato caricato su gel di agarosio al 2,5% e fotografato su un transilluminatore UV.

### **3.5. Dosaggio dei fattori sierici t-PA, MCP-1, sVCAM-1, sP-selectin e sCD40L**

I livelli sierici dei marcatori di rischio cardiovascolare di t-PA, MCP-1, sVCAM-1, sP-selectin e sCD40L sono stati misurati mediante una tecnica di tipo "Multiplex" denominata FlowCytomix (Bender MedSystems, Vienna, Austria). Utilizzando la combinazione dei principi del test ELISA e la citometria a flusso, la metodica consente la misura simultanea di un elevato numero di parametri. Il FlowCytomix si basa sull'impiego di microsferi (beads) di due differenti dimensioni, 4,4  $\mu\text{m}$  e 5,5  $\mu\text{m}$  (Figura 15A). Oltre che per la loro misura, le beads sono differenziate anche per lo spettro della loro fluorescenza. Più precisamente, ognuno dei due tipi di microsferi (da 4,5  $\mu\text{m}$  e 5,5  $\mu\text{m}$ ) può contenere fino a 5 sottopopolazioni marcate con differenti intensità di uno specifico fluorocromo: ciò consente la quantificazione simultanea di un massimo di 10 analiti (Figura 15B). Ogni tipo di microsfera, differente per diametro e intensità di fluorescenza, è coattata con un anticorpo altamente specifico per ciascuna proteina di interesse (Figura 15C). Quando la

miscela di beads, coattate per ogni singola molecola da analizzare, viene incubata con il campione, le proteine presenti nel campione si legano al rispettivo anticorpo monoclonale (Figura 15D). Successivamente, un secondo anticorpo policlonale, marcato con biotina, viene aggiunto alla miscela, andandosi a legare alla proteina precedentemente catturata dal primo anticorpo (Figura 15E). Una volta aggiunte streptavidina e ficoeritrina, tali molecole si legano a loro volta alla biotina emettendo così un segnale fluorescente che può essere analizzato mediante citometria a flusso. I dati letti dallo strumento vengono esportati in un file Excel e quindi elaborati con il software Bender FlowCytomixPro 1.0.4.



**Figura 15.** Funzionamento della metodica FlowCytomix.

Il protocollo utilizzato è illustrato schematicamente di seguito. Dopo aver ricostituito gli standards in acqua distillata, sono state preparate diluizioni seriali 1:3, in modo da ottenere le seguenti concentrazioni:

- S1 = 10000 pg/ml
- S2 = 3333 pg/ml
- S3 = 1111 pg/ml
- S4 = 370 pg/ml
- S5 = 123 pg/ml
- S6 = 41 pg/ml
- S7 = 14 pg/ml
- Bianco = 0 pg/ml

A 15 µL di ciascuno standard o di campione sono stati aggiunti 15 µL di Beads e 30 µL di Biotina-coniugato ed il tutto è stato incubato 2 h al buio a temperatura ambiente. Dopo aver eseguito 2 lavaggi con 1 mL di Assay buffer (200 g per 5 minuti), sono stati aggiunti 30 µL di streptavidina-PE e la miscela è stata incubata 1 h al buio a temperatura ambiente. Dopo ulteriori 2 lavaggi con 1 mL di Assay buffer, il pellet è stato risospeso in un volume finale di 300 µL in Assay buffer. L'acquisizione è stata eseguita al citofluorimetro BD FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) con software CellQuest (Becton Dickinson).

### **3.6. Analisi statistica**

Per la parte della ricerca impostata come studio caso-controllo, le distribuzioni dei polimorfismi nel Gruppo MCV (n=35) e nel Gruppo no MCV (n=132) sono state valutate mediante l'analisi dei dati in tavole di contingenza ed il test del  $\chi^2$ .

Gli studi epidemiologici di tipo caso-controllo sono analisi di associazione, in cui viene paragonata la frequenza di specifici polimorfismi in gruppi di individui affetti da una determinata patologia (casi) e individui non affetti (controlli). Si dice che un polimorfismo è associato alla malattia se si

presenta con frequenza differente tra casi e controlli (più di quello che dovrebbe essere legato alla casualità).

Per stimare il rischio cardiovascolare dopo trapianto associato a ciascun genotipo è stata utilizzata l'analisi di regressione logistica, calcolando i valori di Odds Ratio (OR) con limiti di confidenza al 95%.

Nella fase successiva dell'indagine, nell'ambito dei diversi genotipi i livelli sierici di marker biochimici di rischio cardiovascolare sono stati analizzati mediante t-test di Student e l'ANOVA. I dati sono presentati come media  $\pm$  deviazione standard. Valori di  $p < 0,05$  sono stati considerati statisticamente significativi.

## 4. RISULTATI

Nel presente lavoro, è stato determinato il genotipo su un totale di 167 pazienti portatori di trapianto renale, suddivisi in Gruppo MCV (n=35) e gruppo no MCV (n=132) per i polimorfismi di TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-8, Fas e Casp9. I due gruppi sono risultati in equilibrio di Hardy-Weinberg (dati non mostrati) ed erano omogenei in termini di distribuzione maschi/femmine, età del ricevente, età del donatore, età dialitica, regimi immunosoppressivi, tempo di ischemia fredda e numero di HLA-mismatches.

Per ciascun polimorfismo in esame, le frequenze dei genotipi nei due gruppi sono illustrate mediante tavole di contingenza e relativi grafici.

Successivamente, l'intera popolazione dei trapiantati in studio è stata suddivisa in base ai genotipi e, all'interno di ciascuna "categoria genotipica", sono stati comparati i livelli sierici di alcuni marker biochimici correlati al danno cardiovascolare: omocisteina, Lp(a), CRP, fibrinogeno, colesterolo LDL, t-PA, MCP-1, sVCAM-1, sP-selectin e sCD40L.

### 4.1. Genotipo di TNF- $\alpha$

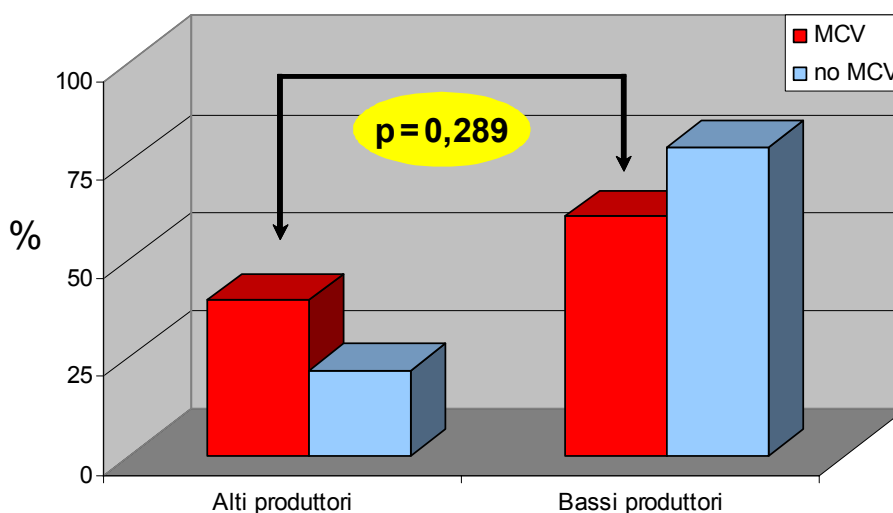
Per il polimorfismo TNF- $\alpha$ /G-308A, il genotipo omozigote AA e quello eterozigote GA sono associati ad alta produzione di TNF- $\alpha$ , mentre il genotipo omozigote GG è associato a bassa produzione.

Nello studio caso-controllo, le frequenze dei genotipi hanno mostrato differenze statisticamente significative tra Gruppo MCV e Gruppo no MCV (Figura 16). In particolare, nel gruppo MCV (n=35), 14 pazienti (40,0%) erano alti produttori e 21 (60,0%) bassi produttori; nel gruppo no MCV (n=132), 28 pazienti (21,2%) erano alti produttori e 104 (78,8%) bassi produttori.

Da questa distribuzione, è emerso che il genotipo alto produttore di TNF- $\alpha$  si presentava con frequenza più alta nel gruppo MCV rispetto al gruppo no

MCV (40,0% vs 21,2%) ed era associato ad un rischio relativo incrementato di 2,4 volte (OR=2,361; 95% C.I.=1,076-5,176; p=0,0289).

TNF- $\alpha$	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Alti produttori</b>	14 (40,0%)	28 (21,2%)
<b>Bassi produttori</b>	21 (60,0%)	104 (78,8%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 16.** Distribuzione dei genotipi di TNF- $\alpha$  nei due gruppi di trapiantati.

Riguardo ai marcatori di danno cardiovascolare considerati, sono stati osservati livelli significativamente più elevati di CRP e di fibrinogeno nei pazienti con genotipo alto produttore di TNF- $\alpha$  rispetto a quelli con genotipo basso produttore. Come si evince dalla Tabella 8, per la CRP sono stati riscontrati valori di  $1,1 \pm 1,6$  mg/dL negli alti produttori di TNF- $\alpha$  e di  $0,5 \pm 0,5$  mg/dL nei bassi produttori ( $p < 0,01$ ) e per il fibrinogeno i livelli erano  $366,6 \pm 83,9$  mg/dL negli alti produttori e di  $327,1 \pm 64,5$  mg/dL nei bassi produttori ( $p < 0,05$ ).

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Alti produttori</b>	<b>Bassi produttori</b>	<b>p (Alti vs Bassi)</b>
Omocisteina ( $\mu\text{mol/L}$ )	23,5 $\pm$ 9,5	20,6 $\pm$ 7,7	n.s.
Lp(a) (mg/dL)	28,5 $\pm$ 32,5	25,6 $\pm$ 40,5	n.s.
CRP (mg/dL)	1,1 $\pm$ 1,6	0,5 $\pm$ 0,5	p<0,01
Fibrinogeno (mg/dL)	366,6 $\pm$ 83,9	327,1 $\pm$ 64,5	p<0,05
Colest. LDL (mg/dL)	120,2 $\pm$ 25,9	117,7 $\pm$ 40,8	n.s.
t-PA (ng/mL)	6,5 $\pm$ 4,1	5,1 $\pm$ 3,9	n.s.
MCP-1 (pg/mL)	128,7 $\pm$ 109,6	237,4 $\pm$ 560,3	n.s.
sVCAM-1 (ng/mL)	1620,5 $\pm$ 1409,6	1456,6 $\pm$ 1421,4	n.s.
sP-selectin (ng/mL)	139,1 $\pm$ 227,2	132,2 $\pm$ 205,5	n.s.
sCD40L (ng/mL)	17,3 $\pm$ 12,3	16,8 $\pm$ 37,6	n.s.

**Tabella 8.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto e basso produttore di TNF- $\alpha$  .

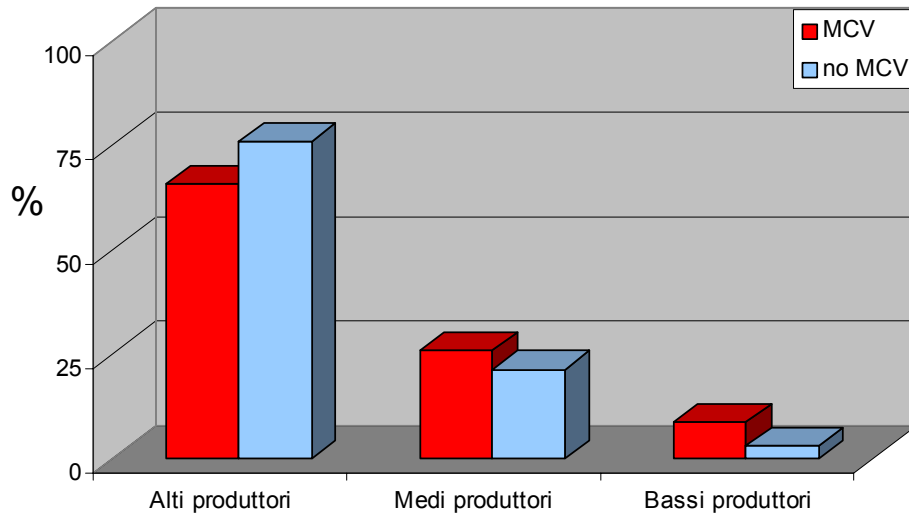
#### 4.2. Genotipo di TGF- $\beta$

I due polimorfismi del gene del TGF- $\beta$ , L10P ed R25P, sono situati nella regione di DNA codificante la sequenza leader della proteina e coinvolgono gli alleli T (leucina) e C (prolina) nel codon 10 e G (arginina) e C (prolina) nel codon 25. La presenza di leucina (+25) e di arginina (+10) corrisponde ad una più alta produzione della proteina.

Nella tavola di contingenza e nel grafico (Figura 17) sono riportate le distribuzioni dei genotipi TGF- $\beta$  nei due gruppi. Nel gruppo MCV, 23 pazienti (65,7%) erano alti produttori, 9 (25,7%) medi produttori e 3 (8,6%) bassi produttori; nel gruppo no MCV, 100 pazienti (75,8%) erano portatori di genotipo alto produttore, 28 (21,2%) di genotipo medio produttore e 4 (3,0%) genotipo basso produttore. Da tale distribuzione non sono emerse differenze statisticamente significative, anche se il genotipo alto produttore risulta leggermente più rappresentato nei pazienti senza eventi cardiovascolari.



TGF- $\beta$	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Alti produttori</b>	23 (65,7%)	100 (75,8%)
<b>Medi produttori</b>	9 (25,7%)	28 (21,2%)
<b>Bassi produttori</b>	3 (8,6%)	4 (3,0%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 17.** Distribuzione dei genotipi di TGF- $\beta$  nei due gruppi di trapiantati.

Dalla valutazione dei marcatori di danno cardiovascolare (Tabella 9), i livelli sierici di sVCAM-1 si sono mostrati significativamente inferiori negli alti e medi produttori di TGF- $\beta$  (rispettivamente  $1456,2 \pm 1272,8$  ng/mL e  $1389,8 \pm 1358,1$  ng/mL) rispetto ai bassi produttori ( $2958,0 \pm 2774,4$ ;  $p < 0,05$ ). Analogamente i livelli di sP-selectin erano significativamente ridotti negli alti e medi produttori rispetto ai bassi produttori ( $135,2 \pm 212,8$ ;  $111,6 \pm 7,3$  e  $325,5 \pm 92,6$ ;  $p < 0,05$ ).

<b>TGF-β</b>	<b>Alti produttori</b>	<b>Medi produttori</b>	<b>Bassi produttori</b>	<b>p (Alti vs Medi)</b>	<b>p (Alti vs Bassi)</b>	<b>p (Medi vs Bassi)</b>
<b>Omocisteina (μmol/L)</b>	19,6±7,5	18,4±4,6	21,2±6,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Lp(a) (mg/dL)</b>	28,5±45,3	24,0±31,6	25,7±33,8	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP (mg/dL)</b>	0,6±0,9	0,7±0,8	0,5±0,4	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fibrinogeno (mg/dL)</b>	319,8±74,5	327,5±63,8	327,8±74,7	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Coolest. LDL (mg/dL)</b>	116,3±35,3	118,0±44,3	108,8±40,4	n.s.	n.s.	n.s.
<b>t-PA (ng/mL)</b>	6,5±5,2	5,1±3,5	4,6±2,5	n.s.	n.s.	n.s.
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	213,2±556,5	244,1±333,2	54,2±55,1	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1456,2±1272,8	1389,8±1358,1	2958,0±2774,4	n.s.	p<0,05	p<0,05
<b>sP-selectin (ng/mL)</b>	135,2±212,8	111,6±7,3	325,5±92,6	n.s.	p<0,05	p<0,05
<b>sCD40L (ng/mL)</b>	19,8±38,9	9,7±8,6	11,5±7,0	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabella 9.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto, medio e basso produttore di TGF-β.

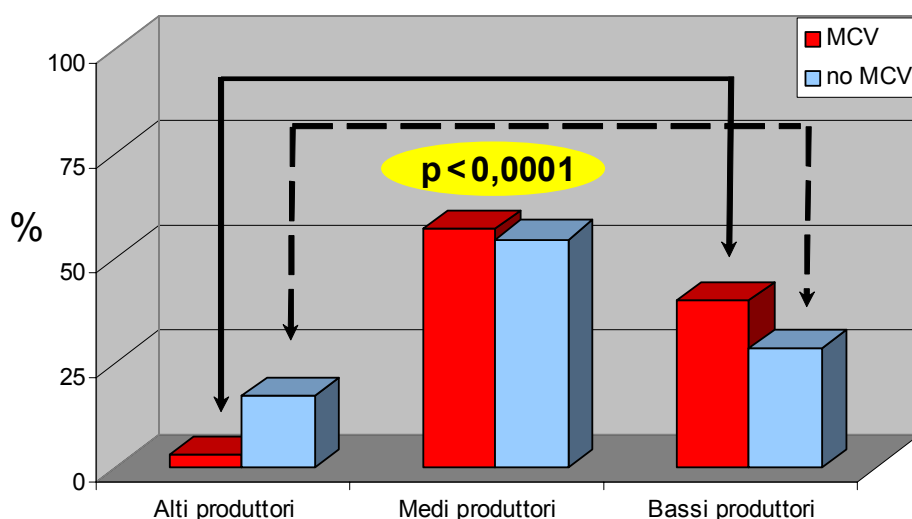
### 4.3. Genotipo di IL-10

I tre polimorfismi del promotore del gene di IL-10, G-1082A, C-819T e C-592A, incidono cooperativamente sui livelli di espressione di IL-10 sia in vivo che in vitro: nello specifico, la presenza contemporanea dell'allele G per il polimorfismo in posizione -1082, dell'allele C per il polimorfismo in posizione -819 e dell'allele C per il polimorfismo in posizione -592 porta a livelli di secrezione alti o medi, a seconda che si trovi rispettivamente in omozigosi o eterozigosi, mentre tutti gli altri aplotipi sono associati a bassa produzione.

Nello studio caso-controllo, è stata riscontrata la seguente distribuzione dei genotipi: nel Gruppo MCV 1 paziente (2,8%) era alto produttore, 23 pazienti (65,7%) erano alti produttori, 20 pazienti (57,7%) erano medi produttori e 14 (40,0%) bassi produttori; nel gruppo no MCV, 22 pazienti (16,7%) erano alti produttori, 72 (54,5%) medi produttori e infine 38 (28,8%) bassi produttori (Figura 18).

L'analisi statistica ha evidenziato come il genotipo alto produttore di IL-10 fosse significativamente più rappresentato nei pazienti no MCV (16,9%), rispetto al Gruppo MCV (2,8%) e risultasse associato ad un rischio relativo di MCV ridotto di circa 3,6 volte (OR=0,278; 95% C.I.= 0,168-0,458,  $p<0,0001$ ).

IL-10	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Alti produttori</b>	1 (2,8%)	22 (16,7%)
<b>Medi produttori</b>	20 (57,7%)	72 (54,5%)
<b>Bassi produttori</b>	14 (40,0%)	38 (28,8%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 18.** Distribuzione dei genotipi di IL-10 nei due gruppi di trapiantati.

Nel confronto dei livelli sierici dei marker in esame tra gli alti, medi e bassi produttori di IL-10, si è stato riscontrato quanto segue (Tabella 10):

- i valori dell'omocisteina erano significativamente inferiori negli alti produttori ( $16,0 \pm 5,8 \mu\text{mol/L}$ ) rispetto ai medi ( $21,3 \pm 8,5 \mu\text{mol/L}$ ) e bassi produttori ( $19,8 \pm 7,1 \mu\text{mol/L}$ ), mentre non vi erano differenze tra i medi e i bassi produttori;
- i livelli di fibrinogeno si sono mostrati significativamente ridotti negli alti rispetto ai bassi produttori ( $276,4 \pm 53,5$  vs  $317,9 \pm 81,7$ ;  $p < 0,005$ );

- il t-PA ha evidenziato differenze significative nei tre genotipi: i livelli misurati negli alti ( $4,6 \pm 2,2$  ng/mL) e medi produttori ( $5,5 \pm 4,6$  ng/mL) erano inferiori rispetto ai bassi produttori ( $7,6 \pm 6,1$  ng/mL).

<b>IL-10</b>	<b>Alti produttori</b>	<b>Medi produttori</b>	<b>Bassi produttori</b>	<b>p (Alti vs Medi)</b>	<b>p (Alti vs Bassi)</b>	<b>p (Medi vs Bassi)</b>
<b>Omocisteina (<math>\mu</math>mol/L)</b>	16,0 $\pm$ 5,8	21,3 $\pm$ 8,5	19,8 $\pm$ 7,1	p<0,01	p<0,05	n.s.
<b>Lp(a) (mg/dL)</b>	27,2 $\pm$ 48,5	28,2 $\pm$ 46,1	26,2 $\pm$ 29,5	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP (mg/dL)</b>	0,3 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,7	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fibrinogeno (mg/dL)</b>	276,4 $\pm$ 53,5	292,2 $\pm$ 80,2	317,9 $\pm$ 81,7	n.s.	p<0,05	n.s.
<b>Coolest. LDL (mg/dL)</b>	115,7 $\pm$ 38,2	115,4 $\pm$ 42,6	116,7 $\pm$ 29,2	n.s.	n.s.	n.s.
<b>t-PA (ng/mL)</b>	4,6 $\pm$ 2,2	5,5 $\pm$ 4,6	7,6 $\pm$ 6,1	n.s.	p<0,05	p<0,05
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	209,7 $\pm$ 136,6	231,3 $\pm$ 263,2	224,2 $\pm$ 196,8	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1638,0 $\pm$ 1530,5	1553,5 $\pm$ 1358,2	1343,6 $\pm$ 1428,7	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sP-selectin (ng/mL)</b>	91,8 $\pm$ 5,9	131,9 $\pm$ 206,7	154,9 $\pm$ 255,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sCD40L (ng/mL)</b>	13,7 $\pm$ 10,0	16,9 $\pm$ 34,2	17,8 $\pm$ 39,6	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabella 10.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto, medio e basso produttore di IL-10.

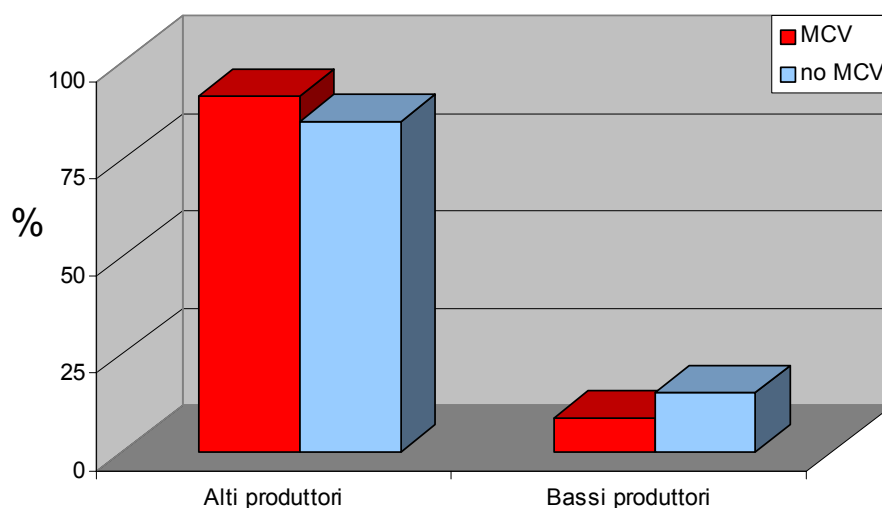
#### 4.4. Genotipo di IL-6

Il polimorfismo in posizione -174 del promotore del gene di IL-6 è stato anch'esso associato alla produzione della citochina. È stato dimostrato infatti che la presenza dell'allele C in omozigosi riduce l'espressione genica di IL-6, per cui i portatori dei genotipi GG o GC sono alti produttori, mentre gli individui con genotipo CC sono bassi produttori.

Nella popolazione di trapiantati renali in studio, si è osservata la seguente distribuzione dei genotipi di IL-6: nel gruppo MCV (n=35), 32 pazienti (80,0%) erano alti produttori e 3 pazienti (8,6%) bassi produttori; nel gruppo no MCV (n=132), 112 pazienti (84,9%) erano alti produttori e 20 pazienti (15,1%) bassi produttori. Seppure gli alti produttori siano più rappresentati nel gruppo di pazienti andati incontro ad eventi cardiovascolari dopo trapianto

rispetto a quelli senza tali complicanze (91,4% vs 84,9), tali differenze nelle distribuzioni dei genotipi non sono risultate significative (Figura 19).

IL-6	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Alti produttori</b>	32 (91,4%)	112 (84,9%)
<b>Bassi produttori</b>	3 (8,6%)	20 (15,1%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 19.** Distribuzione dei genotipi di IL-6 nei due gruppi di trapiantati.

Come si evince dalla Tabella 11, non si osservano differenze significative nei livelli dei marker esaminati.

IL-6	Alti produttori	Bassi produttori	p (Alti vs Bassi)
Omocisteina (μmol/L)	19,5±7,5	20,5±9,0	n.s.
Lp(a) (mg/dL)	25,9±41,0	27,6±30,2	n.s.
CRP (mg/dL)	0,6±0,9	0,5±0,3	n.s.
Fibrinogeno (mg/dL)	319,5±72,8	333,9±56,6	n.s.
Coolest. LDL (mg/dL)	117,9±39,2	105,0±23,0	n.s.
t-PA (ng/mL)	6,2±4,9	5,7±2,5	n.s.
MCP-1 (pg/mL)	213,2±509,7	246,8±231,0	n.s.
sVCAM-1 (ng/mL)	1556,7±1427,6	1336,6±457,2	n.s.
sP-selectin (ng/mL)	136,0±214,1	91,6±6,4	n.s.
sCD40L (ng/mL)	16,7±34,2	15,9±10,3	n.s.

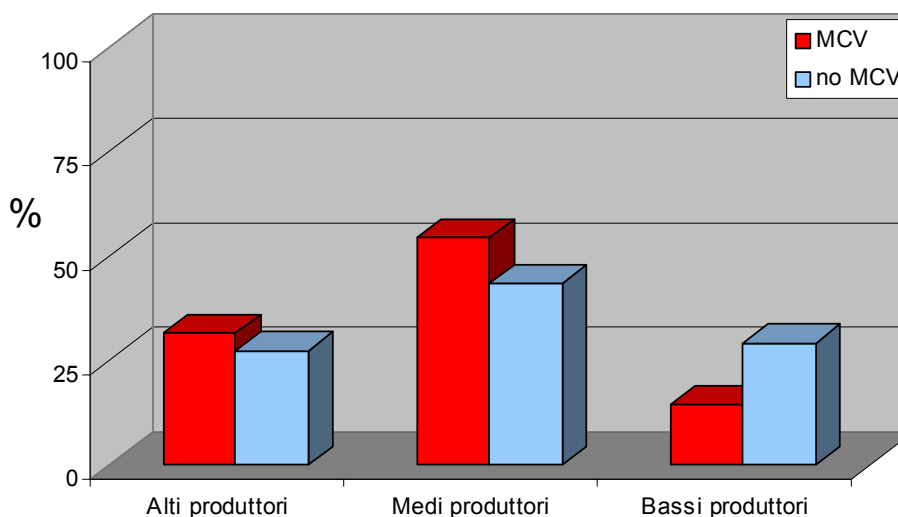
**Tabella 11.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto e basso produttore di IL-6.

#### 4.5. Genotipo di IFN- $\gamma$

Per il polimorfismo T→A in posizione +874 nel primo introne del gene dell'IFN- $\gamma$ , è stato riportato che la presenza dell'allele T sia associato ad un incremento dell'attività trascrizionale del gene. Perciò, gli individui TT sono alti produttori, gli eterozigoti TA produttori intermedi ed infine i portatori del genotipo AA sono bassi produttori di IFN- $\gamma$  (Pravica 2000).

Nel gruppo MCV la distribuzione dei genotipi era: 11 pazienti (31,4%) alti produttori, 19 (54,3%) medi produttori e 5 (14,3%) bassi produttori; nel gruppo no MCV: 37 (28,0%) alti produttori, 57 (43,2%) medi produttori e 38 (28,8%) bassi produttori (Figura 20).

IFN- $\gamma$	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Alti produttori</b>	11 (31,4%)	37 (28,0%)
<b>Medi produttori</b>	19 (54,3%)	57 (43,2%)
<b>Bassi produttori</b>	5 (14,3%)	38 (28,8%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 20.** Distribuzione dei genotipi di IFN- $\gamma$  nei due gruppi di trapiantati.

Come riportato nella Tabella 12, tra i marker sierici valutati, i valori di omocisteinemia degli alti produttori di IFN- $\gamma$  ( $22,0 \pm 8,2$   $\mu\text{mol/L}$ ) erano significativamente più elevati rispetto ai medi ( $18,6 \pm 6,3$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0,05$ ) e ai bassi produttori ( $18,2 \pm 5,8$   $\mu\text{mol/L}$ ;  $p < 0,05$ ).

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Alti produttori</b>	<b>Medi produttori</b>	<b>Bassi produttori</b>	<b>p (Alti vs Medi)</b>	<b>p (Alti vs Bassi)</b>	<b>p (Medi vs Bassi)</b>
<b>Omocisteina (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	22,0 $\pm$ 8,2	18,6 $\pm$ 6,3	18,2 $\pm$ 5,8	p<0,05	p<0,05	n.s.
<b>Lp(a) (mg/dL)</b>	28,2 $\pm$ 31,5	29,0 $\pm$ 51,3	26,1 $\pm$ 37,8	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP (mg/dL)</b>	0,5 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,4	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fibrinogeno (mg/dL)</b>	321,5 $\pm$ 60,4	313,2 $\pm$ 79,7	339,7 $\pm$ 72,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Coolest. LDL (mg/dL)</b>	115,2 $\pm$ 31,0	118,1 $\pm$ 39,4	121,1 $\pm$ 31,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>t-PA (ng/mL)</b>	5,1 $\pm$ 3,1	4,9 $\pm$ 4,3	5,5 $\pm$ 3,9	n.s.	n.s.	n.s.
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	110,5 $\pm$ 132,1	183,0 $\pm$ 238,4	343,1 $\pm$ 888,9	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1759,1 $\pm$ 1306,2	1307,0 $\pm$ 1219,1	1317,5 $\pm$ 911,5	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sP-selectin (ng/mL)</b>	124,8 $\pm$ 194,1	161,1 $\pm$ 272,5	98,9 $\pm$ 17,1	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sCD40L (ng/mL)</b>	20,5 $\pm$ 44,0	16,9 $\pm$ 35,4	13,1 $\pm$ 9,9	n.s.	n.s.	n.s.

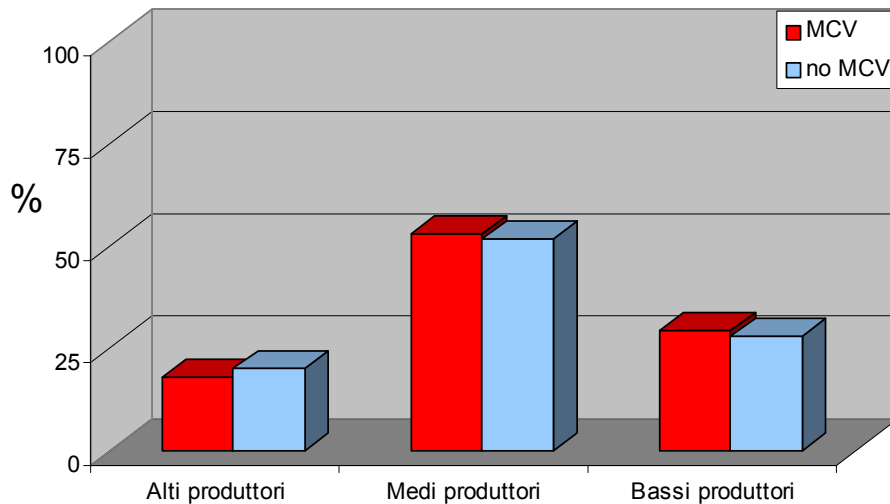
**Tabella 12.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto, medio e basso produttore di IFN- $\gamma$ .

#### 4.6. Genotipo di IL-8

Per la sostituzione T->A nella posizione -251 del promotore del gene IL-8, è stata dimostrata un'associazione dell'allele A con una più alta produzione di tale chemochina.

All'interno della nostra popolazione, è stata osservata una prevalenza simile dei genotipi nel Gruppo MCV e nel Gruppo no MCV (Figura 21). Nel primo, i pazienti con genotipo alto produttore TT erano 6 (17,1%), quelli con genotipo medio produttore TA erano 19 (54,3%) e quelli con genotipo basso produttore AA erano 10 (28,6%); nel Gruppo di trapiantati senza complicanze cardiovascolari la distribuzione era: 26 alti produttori (19,7%), 68 medi produttori (51,5%) e 38 bassi produttori (28,8%).

IL-8	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Alti produttori</b>	6 (17,1%)	26 (19,7%)
<b>Medi produttori</b>	19 (54,3%)	68 (51,5%)
<b>Bassi produttori</b>	10 (28,6%)	38 (28,8%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 21.** Distribuzione dei genotipi di IL-8 nei due gruppi di trapiantati.

La Tabella 13 riporta i valori sierici dei marker di danno cardiovascolare presi in esame in questo studio. Nei pazienti portatori di genotipo alto, medio e basso produttore di IL-8, i livelli sierici di tali marcatori biochimici non differivano in maniera significativa.

IL-8	Alti produttori	Medi produttori	Bassi produttori	p (Alti vs Medi)	p (Alti vs Bassi)	p (Medi vs Bassi)
<b>Omocisteina (μmol/L)</b>	19,9±6,9	20,4±8,6	19,0±5,5	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Lp(a) (mg/dL)</b>	17,3±20,9	24,9±32,0	42,7±66,8	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP (mg/dL)</b>	0,9±1,7	0,5±0,4	0,6±0,7	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fibrinogeno (mg/dL)</b>	312,1±113,2	326,5±62,3	316,5±54,8	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Coolest. LDL (mg/dL)</b>	126,6±59,0	113,7±32,0	114,9±39,6	n.s.	n.s.	n.s.
<b>t-PA (ng/mL)</b>	6,1±2,8	5,9±4,0	7,5±7,3	n.s.	n.s.	n.s.
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	226,7±325,8	225,8±653,1	207,6±225,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1101,3±1078,3	1419,7±1339,3	1678,3±1405,4	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sP-selectin (ng/mL)</b>	94,7±29,0	151,6±95,8	91,2±55,2	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sCD40L (ng/mL)</b>	11,9±8,1	12,9±9,2	15,5±12,5	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabella 13.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto, medio e basso produttore di IL-8.

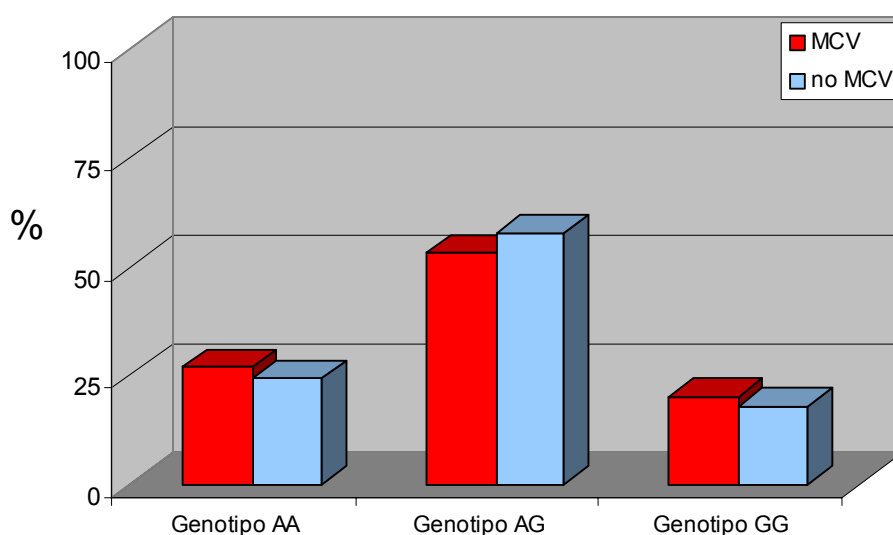


#### 4.7. Genotipo di Fas

Riguardo al polimorfismo del Fas/G-670A, è stato dimostrato che la presenza dell'allele A elimina un putativo elemento di trascrizione nucleare GAS rendendo meno efficiente la trascrizione del gene. Seppure tali dati derivino da modelli in vitro e non siano ancora stati confermati in vivo, è ipotizzabile che i portatori dell'allele A abbiano una maggiore produzione individuale di Fas rispetto ai portatori dell'allele G.

Le frequenze dei genotipi nei due gruppi di trapiantati in studio era sovrapponibile (Figura 22): nel Gruppo MCV, 9 omozigoti AA (25,7%), 19 eterozigoti AG (54,3%) e 7 omozigoti GG (20,0%); nel Gruppo no MCV, 32 omozigoti AA (24,2%), 76 eterozigoti AG (57,6%) e 25 omozigoti GG (18,1%).

Fas	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
Genotipo AA	9 (25,7%)	32 (24,2%)
Genotipo AG	19 (54,3%)	76 (57,6%)
Genotipo GG	7 (20,0%)	24 (18,1%)
<i>Totale</i>	<i>35 (100%)</i>	<i>132 (100%)</i>



**Figura 22.** Distribuzione dei genotipi di Fas nei due gruppi di trapiantati.

I valori dei marker in esame (Tabella 14) non differivano in maniera rilevante tra i diversi genotipi.

<b>Fas</b>	<b>Genotipo AA</b>	<b>Genotipo AG</b>	<b>Genotipo GG</b>	<b>p (AA vs AG)</b>	<b>p (AA vs GG)</b>	<b>p (AG vs GG)</b>
<b>Omocisteina (μmol/L)</b>	19,1±5,9	19,8±7,5	21,3±10,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Lp(a) (mg/dL)</b>	32,0±28,3	23,4±34,1	28,5±59,9	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP (mg/dL)</b>	0,5±0,5	0,7±1,2	0,5±0,4	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fibrinogeno (mg/dL)</b>	305,6±60,8	323,5±85,5	328,9±58,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Colest. LDL (mg/dL)</b>	112,0±37,7	115,4±32,3	121,9±53,2	n.s.	n.s.	n.s.
<b>t-PA (ng/mL)</b>	6,2±5,8	6,0±4,5	5,8±3,7	n.s.	n.s.	n.s.
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	220,7±260,8	152,9±221,4	355,7±950,2	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1539,4±1616,8	1448,5±1626,2	1226,7±1112,6	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sP-selectin (ng/mL)</b>	124,6±191,3	141,8±229,4	137,4±218,2	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sCD40L (ng/mL)</b>	19,6±42,8	17,2±36,4	14,0±10,2	n.s.	n.s.	n.s.

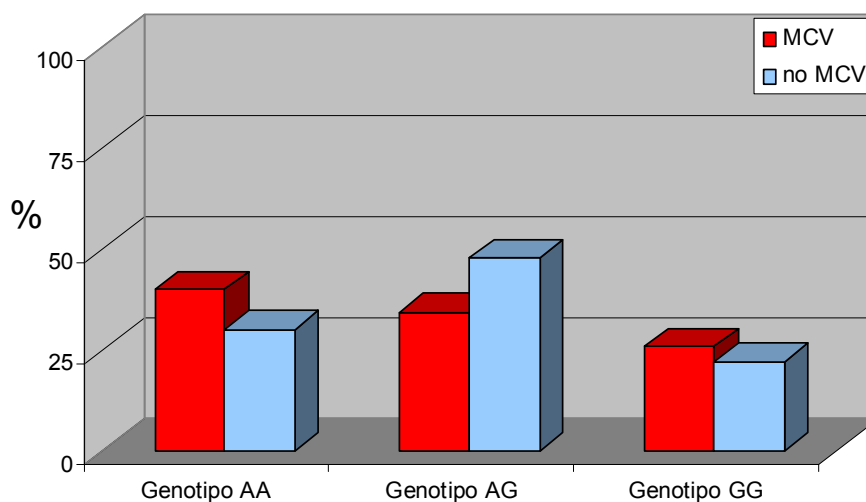
**Tabella 14.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo alto, medio e basso produttore di Fas.

#### 4.8. Genotipo di Caspasi 9

Il polimorfismo R221Q del gene della Caspasi 9 determina una sostituzione aminoacidica di una glutamina con un arginina nel codon 221.

Nella nostra casistica di trapiantati renali, si è osservato che i diversi genotipi si distribuivano in maniera comparabile tra i pazienti con e senza eventi cardiovascolari (Figura 23). In particolare, le distribuzioni dei genotipi erano le seguenti: nel Gruppo MCV, 14 pazienti erano AA (40,0%), 12 AG (34,3%) e 9 GG (25,7%); nel Gruppo no MCV 40 pazienti erano AA (30,3%), 63 AG (47,7%) e 29 GG (22,0%).

Casp9	Gruppo MCV (n=35)	Gruppo no MCV (n=132)
<b>Genotipo AA</b>	14 (40,0%)	40 (30,3%)
<b>Genotipo AG</b>	12 (34,3%)	63 (47,7%)
<b>Genotipo GG</b>	9 (25,7%)	29 (22,0%)
<b>Totale</b>	35 (100%)	132 (100%)



**Figura 23.** Distribuzione dei genotipi di Casp9 nei due gruppi di trapiantati.

Nessuno dei marcatori considerati ha mostrato livelli significativamente differenti nei portatori dei vari genotipi di Casp9 (Tabella 15).

Casp9	Genotipo AA	Genotipo AG	Genotipo GG	p (AA vs AG)	p (AA vs GG)	p (AG vs GG)
<b>Omocisteina (μmol/L)</b>	21,4±10,7	19,9±6,7	17,7±4,4	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Lp(a) (mg/dL)</b>	25,6±28,2	27,1±50,6	30,9±42,5	n.s.	n.s.	n.s.
<b>CRP (mg/dL)</b>	0,7±0,8	0,6±1,0	0,4±0,3	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fibrinogeno (mg/dL)</b>	330,4±48,3	321,1±85,8	313,4±61,1	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Coolest. LDL (mg/dL)</b>	112,4±28,6	116,5±43,5	118,5±42,3	n.s.	n.s.	n.s.
<b>t-PA (ng/mL)</b>	5,2±2,4	6,7±6,1	7,1±3,9	n.s.	n.s.	n.s.
<b>MCP-1 (pg/mL)</b>	200,6±235,3	143,1±145,2	437,2±1058,7	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sVCAM-1 (ng/mL)</b>	1278,8±1461,0	1508,1±1331,6	1407,8±1190,2	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sP-selectin (ng/mL)</b>	91,3±5,5	141,3±227,0	145,2±243,0	n.s.	n.s.	n.s.
<b>sCD40L (ng/mL)</b>	23,2±49,5	16,6±35,2	15,2±11,2	n.s.	n.s.	n.s.

**Tabella 15.** Valori sierici dei marcatori biochimici di rischio cardiovascolare nei pazienti portatori di genotipo AA, AG e GG di Caspasi 9.

## 5. DISCUSSIONE

La patologia cardiovascolare dopo trapianto renale riconosce una patogenesi multifattoriale in cui ha un ruolo cardine il danno cumulativo ed incrementale caratterizzante la storia clinica di questi pazienti dall'esordio dell'insufficienza renale fino alla fase post-trapianto. È verosimile che nella progressione della MCV intervenga una combinazione di eventi immunologici, infiammatori ed apoptotici legati alla durata del trattamento sostitutivo artificiale, al prolungato stato di anemia, alla terapia immunosoppressiva, alle alterazioni dismetaboliche.

Diverse evidenze hanno dimostrato come la produzione e la funzione di molti degli effettori molecolari coinvolti nella complessa biologia del paziente trapiantato siano sotto controllo genetico in quanto legati alla presenza di specifici polimorfismi funzionali. Per questa ragione, le differenze interindividuali nel decorso clinico post-trapianto dei vari pazienti in relazione all'incidenza di eventi cardiovascolari potrebbero essere almeno in parte spiegate dall'influenza di un'importante componente genetica.

Nel presente lavoro si è investigato l'impatto sul rischio cardiovascolare dopo trapianto renale dei polimorfismi delle citochine pro-infiammatorie TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-8, delle citochine anti-infiammatorie IL-10 e TGF- $\beta$  e degli effettori di apoptosi Fas e Caspasi 9.

Diversi studi sulla popolazione generale hanno rilevato un ruolo del TNF- $\alpha$  nella patogenesi della MCV [Ross 1999]. Mizia-Stec *et al.* hanno riportato come in pazienti con angina stabile o instabile il rilascio di tale citochina da parte dei leucociti sia significativamente incrementato rispetto a quello osservato in un gruppo di controlli sani [Mizia-Stec 2002]. Inoltre un aumento sia del TNF- $\alpha$  a livello locale che di quello circolante si verifica durante l'infarto [Ridker 2000]. Sul ruolo del polimorfismo TNF- $\alpha$ /G-308A come fattore di rischio cardiovascolare nella popolazione generale, i dati in letteratura sono spesso disomogenei. Bernard *et al.* hanno osservato una maggiore prevalenza del genotipo alto produttore di TNF- $\alpha$  in pazienti con

angina instabile [Bernard 2003]. In contrasto, secondo altri autori, il polimorfismo di TNF- $\alpha$  non influenzerebbe il rischio di stenosi coronarica, infarto acuto del miocardio, trombosi coronarica [Keso 2001] o scompenso cardiaco congestizio [Kubota 1998].

A fronte dei numerosi studi disponibili sulla popolazione generale, l'influenza del genotipo di TNF- $\alpha$  sul rischio cardiovascolare dopo trapianto d'organo è stata poco indagata. In un lavoro di Altun *et al.*, eseguito su una casistica di 72 trapiantati renali, non sono state trovate differenze significative in termini di pressione arteriosa (misurata con monitoraggio ambulatoriale delle 24 ore), VES e livelli sierici di lipoproteine, fibrinogeno e CRP nei portatori dei differenti genotipi di TNF- $\alpha$  [Altun 2005]. Secondo l'autore, tale riscontro sembrerebbe indicare che nelle fasi precoci dell'aterosclerosi, i livelli di citochine infiammatorie giocano un ruolo ancora limitato e le differenze nella produzione individuale legate al genotipo non hanno un impatto diretto sui parametri esaminati. I nostri dati suggeriscono, al contrario, una significativa associazione tra il genotipo alto produttore di TNF- $\alpha$  ed il rischio cardiovascolare dopo trapianto renale. La discordanza di tale riscontro rispetto ai risultati di Altun potrebbe essere motivata, almeno in parte, dal differente approccio metodologico applicato. Lo studio di tipo caso-controllo utilizzato nel presente lavoro e per la prima volta in questo ambito, presuppone una suddivisione della popolazione di trapiantati sulla base della presenza/assenza di un evento cardiovascolare e dunque valuta l'impatto del fattore genetico in relazione all'occorrenza della patologia. Il lavoro di Altun, al contrario, è uno studio osservazionale di follow-up in cui viene indagato il ruolo dell'esposizione ad uno specifico fattore di rischio, in questo caso il polimorfismo genetico, per ottenere stime di associazione tra esposizione e rischio di malattia. Tuttavia, in alcune condizioni, ad esempio nel caso di patologie a lunga latenza, può necessitare di un tempo di osservazione estremamente prolungato. È possibile dunque che il dato negativo sul ruolo del polimorfismo di TNF- $\alpha$  ottenuto dall'autore sia legato al fatto di aver analizzato alcuni marcatori di rischio cardiovascolare nei trapiantati portatori

dei differenti genotipi, senza però contemplare l'incidenza dell'evento cardiovascolare. Un approccio analogo è stato comunque utilizzato anche nello studio presente, ma come supporto ai dati ottenuti dal caso-controllo. Per la citochina proflogistica TNF- $\alpha$ , sono stati riscontrati livelli sierici significativamente più elevati di CRP e di fibrinogeno negli alti produttori rispetto ai bassi produttori e tale dato sembrerebbe confermare l'ipotesi secondo cui la presenza dell'allele G correlato con un più intensa attività trascrizionale del gene esporrebbe i pazienti ad uno stato pro-infiammatorio in grado di incrementare il rischio cardiovascolare dopo trapianto.

L'IL-10 è il più potente downregolatore della risposta infiammatoria e la sua produzione locale da parte dei macrofagi nella placca ateromatosa rappresenta un possibile meccanismo protettivo nei confronti del danno vascolare [Pinderski Oslund 1999]. Analogamente ad altre citochine, la sua sintesi è geneticamente regolata, in quanto la combinazione di tre polimorfismi del promotore definisce nella popolazione tre livelli di produzione, alta, intermedia e bassa. Come per il TNF- $\alpha$ , il ruolo del genotipo di IL-10 in relazione all'aterosclerosi e al rischio cardiovascolare è dibattuto. Alcuni autori non hanno trovato correlazioni significative tra i polimorfismi di IL-10 ed il rischio di eventi cardiovascolari nella popolazione generale [Koch 2001, Donger 2001]. Un lavoro di Girndt *et al.* ha analizzato il ruolo di tali varianti geniche nel modulare il rischio cardiovascolare nei pazienti in emodialisi ed ha osservato una maggiore morbilità cardiovascolare nei portatori dell'allele A per il polimorfismo in posizione -1082. Bisogna specificare che seppure la produzione di IL-10 in vivo ed in vitro sia legata all'effetto globale dei tre polimorfismi, quello in posizione -1082 influenza l'espressione genica in misura maggiore rispetto agli altri due nelle posizioni -592 e -819 per il fatto di trovarsi localizzato in un sito di legame con un fattore di trascrizione [Turner 1997]. Lo stesso polimorfismo analizzato in un gruppo di 71 trapiantati di cuore ha evidenziato come il genotipo AA associato a bassa produzione di IL-10 correlasse significativamente con lo sviluppo di lesioni rilevate con biopsia endomiocardica [Plaza 2003]. Anche

nella nostra casistica di trapiantati renali, il genotipo di IL-10 sembra svolgere un importante ruolo sul rischio cardiovascolare. Gli alti produttori di IL-10 erano infatti significativamente prevalenti nel gruppo dei controlli (no MCV) e risultavano “protetti” dal rischio di eventi cardiovascolari rispetto ai casi, con un rischio relativo pari a 0,278. Inoltre, tale categoria genotipica mostrava anche livelli significativamente ridotti di omocisteina, fibrinogeno e t-PA. Tali dati sembrano supportare l’ipotesi che un’alta produzione sotto controllo genetico di fattori anti-flogistici come IL-10 possa avere un effetto positivo nel modulare la risposta infiammatoria e controllare la progressione dell’aterosclerosi dopo trapianto renale.

Il TGF- $\beta$  infatti è un fattore di crescita pleiotropico prodotto da numerose popolazioni cellulari in grado di downregolare l’espressione delle citochine pro-infiammatorie, controllare l’adesione di cellule infiammatorie all’endotelio ed indurre l’apoptosi nelle cellule presenti nelle lesioni ateromatose [Ross 1999]. Diversi report hanno dimostrato come bassi livelli di tale mediatore si associno alla presenza di aterosclerosi e ad un maggior rischio di MCV [Tashiro 1997, Grainger 1995]. La correlazione tra TGF- $\beta$  e patologia cardiovascolare è stata indagata da Stefoni *et al.* in un gruppo di 155 pazienti in trattamento emodialitico: confrontando i valori sierici del TGF- $\beta$  circolante tra i dializzati senza evidenza di MCV e dializzati con complicanze cardiovascolari (malattia coronarica, cerebrovasculopatia, malattia vascolare periferica), sono stati riscontrati livelli significativamente più bassi in questi ultimi. Inoltre, durante il periodo di follow-up si è osservato che una riduzione di 1 ng/mL nel TGF- $\beta$  circolante era associata ad un aumento del 9% nel rischio relativo di sviluppare un evento cardiovascolare. Le cause della ridotta concentrazione di TGF- $\beta$  nella popolazione uremica risiederebbero negli elevati livelli di Lp(a) e t-PA [Stefoni 2001].

La produzione di TGF- $\beta$  è influenzata dalla presenza dei due polimorfismi sul codon 10 e 25, le cui combinazioni alleliche definiscono nella popolazione generale gli alti, medi e bassi produttori [Grainger 1999]. Nel presente studio,

il genotipo alto produttore di TGF- $\beta$  si presentava con una prevalenza superiore nei pazienti senza complicanze cardiovascolari, mentre i bassi produttori erano maggiormente rappresentati nei pazienti andati incontro ad eventi cardiovascolari, anche se tali differenze non hanno raggiunto significatività statistica. Tuttavia, ulteriori studi su una casistica più ampia sono necessari per chiarire meglio l'impatto del genotipo di TGF- $\beta$  sui meccanismi aterosclerotici dopo trapianto. Infatti, la valutazione dei marcatori di danno cardiovascolare (Tabella 9), ha evidenziato livelli sierici di sVCAM-1 e sP-selectin significativamente più elevati nei bassi produttori di TGF- $\beta$  rispetto agli alti produttori. In diversi modelli sperimentali è stato dimostrato che nel processo di aterosclerosi si verifica un aumento di VCAM-1 e P-selectin sia a livello locale con un'iperpressione nella porzione di endotelio che sovrasta la placca aterosclerotica, sia nei livelli circolanti [Misiakos 2001, Lafontan 1996]. Dal momento che il TGF- $\beta$  svolge un ruolo protettivo nel mantenimento della stabilità della placca stessa [Grainger 1995], è ipotizzabile che i pazienti con una bassa produzione genetica di tale mediatore anti-infiammatorio siano più esposti a sviluppare complicanze cardiovascolari dopo trapianto di rene.

I polimorfismi genici delle altre citochine studiate, IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-8 e dei geni di apoptosi Fas e Caspasi 9 non sembrano essere associati al rischio di MCV dopo trapianto.

L'unico dato significativo è stato il riscontro di valori di omocisteinemia significativamente più elevati negli alti produttori di IFN- $\gamma$  rispetto ai medi e bassi produttori. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che l'IFN- $\gamma$  ed i macrofagi, principali produttori della molecola, hanno un ruolo centrale nel processo di formazione delle lesioni ateromatose. Insieme ad altre citochine pro-infiammatorie, infatti, IFN- $\gamma$  è un potente induttore per la formazione di radicali liberi, il cui aumento determina la deplezione di antiossidanti come vitamina C, vitamina E e glutazione. Lo stress ossidativo, oltre ad avere un ruolo sull'aterosclerosi e sulla progressione



del danno cardiovascolare, può portare all'ossidazione di acido folico e vitamina B12 che sono cofattori essenziali nel metabolismo dell'omocisteina. Il riscontro di livelli aumentati di omocisteina nei trapiantati renali con genotipo alto produttore di IFN- $\gamma$  è in linea con altri studi in cui è stata documentata un'associazione tra moderata iperomocisteinemia e stato infiammatorio [Schroecksnadel 2006]. Al momento, però, il dato singolo dell'omocisteina non è supportato da risultati statisticamente significativi derivanti dallo studio caso-controllo. Nella nostra popolazione di trapiantati, la prevalenza tendenzialmente superiore del genotipo alto e medio produttore di IFN- $\gamma$  osservata nei pazienti del Gruppo MCV sembra indicare che un'alta produzione genetica di tale fattore pro-infiammatorio costituisca un fattore di rischio cardiovascolare dopo trapianto di rene, ma questa ipotesi andrà chiarita in studi successivi.

## 6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Nel presente lavoro è stato analizzato il possibile ruolo dei polimorfismi di geni legati a processi di infiammazione e di apoptosi nella patogenesi della MCV dopo trapianto renale. L'obiettivo è stato quello di identificare un vero e proprio profilo genetico di rischio o di protezione nei confronti della patologia cardiovascolare che ad oggi resta la principale causa di morte con graft funzionante dopo trapianto renale.

I risultati dello studio, basato sull'approccio epidemiologico caso-controllo, il primo in ambito di MCV dopo trapianto renale, possono essere così schematizzati:

- il genotipo alto produttore della citochina pro-flogistica TNF- $\alpha$  è associato ad un rischio relativo di andare incontro ad eventi cardiovascolari dopo trapianto incrementato di 2,4 volte;
- il genotipo alto produttore della citochina anti-infiammatoria IL-10 rappresenta un fattore di protezione nei confronti del rischio cardiovascolare nei trapiantati renali, con un rischio relativo diminuito di 3,6 volte;
- il genotipo basso produttore di TGF- $\beta$  sembra essere associato ad una peggior prognosi in termini di rischio cardiovascolare dopo trapianto, anche se il dato dello studio caso-controllo non ha raggiunto significatività statistica. Tuttavia gli elevati livelli sierici di sVCAM-1 e di sP-selectin riscontrati nei trapiantati renali bassi produttori di TGF- $\beta$  lasciano intravedere un possibile ruolo del genotipo di TGF- $\beta$  nello sviluppo della placca aterosclerotica, che va meglio chiarito ampliando la casistica dei pazienti;
- i polimorfismi delle citochine IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-8 e delle molecole di apoptosi Fas e Caspasi 9 non sembrano influire sull'incidenza di complicanze cardiovascolari dopo trapianto di rene.

Con le ricerche future, si cercherà di verificare se i marcatori genetici identificati rappresentino effettivamente fattori di rischio cardiovascolare nei trapiantati renali e di stabilire se i pazienti che hanno una maggiore incidenza di questi marker siano da sottoporre a indagini particolari e ad una profilassi primaria più aggressiva. In particolare gli studi successivi dovrebbero specificamente investigare le interazioni fra polimorfismi genetici candidati e fattori di rischio ambientali per una migliore comprensione delle vie fisiopatologiche e per l'identificazione di nuovi target terapeutici.

Attraverso la misura di combinazioni di polimorfismi in geni coinvolti nel meccanismo aterosclerotico nella popolazione dei trapiantati renali, si potrà costruire una mappa di rischio genetico che potrà essere di aiuto nell'identificazione di soggetti particolarmente predisposti alla MCV che possano beneficiare di trattamenti preventivi più mirati ed efficaci.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aakhus S, Dahl K, Wideroe TE. Cardiovascular morbidity and risk factors in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Mar;14(3):648-54.
- Aakhus S, Dahl K, Wideroe TE. Cardiovascular disease in stable renal transplant patients in Norway: morbidity and mortality during a 5-yr follow-up. *Clin Transplant*. 2004 Oct;18(5):596-604.
- Abate N. Obesity as a risk factor for cardiovascular disease. *Am J Med* 1999; 107:S125-35.
- Abbas AK, Lichtman AH et al. *Immunologia cellulare e molecolare*. Piccin Nuova Libreria S.P.A 1998.
- Akalin E, Murphy B. Gene polymorphisms and transplantation. *Current Opinion in Immunology* 2001; 13:572-6.
- Alakulppi NS, Kyllonen LE, et al. Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation*. 2004 Nov 27;78(10):1422-8.
- Altun B, Yilmaz R et al. Impact of cytokine gene polymorphism on cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Transpl Int*. 2005 Jun;18(6):681-9.
- Amer P, Bülow J. Assessment of adipose tissue metabolism in man: Comparison of Fick and microdialysis techniques. *Clinical Science* 1993;85:247-256.
- Ankersmit HJ, Moser B et al. Activation-induced T cell death, and aberrant T cell activation via TNFR1 and CD95-CD95 ligand pathway in stable cardiac transplant recipients. *Clin Exp Immunol*. 2002 Apr;128(1):175-80.
- Arnadóttir M, Hultberg B et al. Hyperhomocysteinemia in cyclosporine treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1996; 61:509-12.
- Asderakis A, Sankaran D et al. Association of polymorphisms in the human interferon- $\gamma$  and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome. *Transplantation* 2001; 71(5):674-8.
- Babinska A, Markell MS et al. Enhancement of human platelet aggregation and secretion induced by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant*. 1998 Dec;13(12):3153-9.
- Bernard V, Pillois X et al. The -308 G/A tumor necrosis- $\alpha$  gene dimorphism: a risk factor for unstable angina. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:511.
- Best PJ, Hasdai D et al. Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Jan;19(1):14-22.
- Bostom AG, Gohl RY et al. Excess prevalence of fasting and post-methionine-loading hyperhomocysteinemia in stable renal transplant recipients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1894-900.
- Bostom AG, Gohl RY et al. Determinants of fasting plasma total homocysteine levels among chronic stable renal transplant recipients. *Transplantation* 1999;68:257-61.
- Bouma G, Crusius JB et al. Secretion of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-

DR alleles: relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 1996;43:456-463.

- Briggs JD. Causes of death after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Aug;16(8):1545-9.
- Busch M, Franke S et al. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney Int*. 2004 Jul;66(1):338-47.
- Campise MR, Bamonti F et al. Oxidative stress in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2003;76:1474-8.
- Cappellesso S, Valentin JF et al. Recipient TNFRSF6 (FAS) gene polymorphism and acute renal allograft rejection. *Transplant Proc*. 2002 May;34(3):803-4.
- Cappellesso S, Valentin JF et al. Association of donor TNFRSF6 (FAS) gene polymorphism with acute rejection in renal transplant patients: a case-control study. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Feb;19(2):439-43.
- Cartwright NH, Keen LJ, et al. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. *Transplant immunology* 2001; 8:237-244.
- Castillo-Lugo JA, Vergne-Marini P. Hypertension in kidney transplantation. *Semin Nephrol*. 2005 Jul;25(4):252-60.
- Copley JB, Staffeld C et al. Cyclosporine to tacrolimus: effect on hypertension and lipid profiles in renal allografts. *Transplant Proc*. 1998 Jun;30(4):1254-6.
- Cosio FG, Falkentrain MF, Pesavento PE, et al. Patient survival data after renal transplantation: II. The input of smoking. *Clin Transplant* 1999; 13:336-41.
- Cosio FG, Kudva Y et al. New onset hyperglycemia and diabetes are associated with increased cardiovascular risk after kidney transplantation. *Kidney Int*. 2005; 67(6):2415-21.
- Cristol JP, Vela C et al. Oxidative stress and lipid abnormalities in renal transplant recipients with or without chronic rejection. *Transplantation*. 1998 May 27;65(10):1322-8.
- Culleton BF, Larson MG et al. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999; 56:2214-9.
- Dedoussis GVZ, Panagiotakos DB et al. An association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T mutation and inflammatory markers related to cardiovascular disease. *Int J Card* 2005; 100:409-414.
- Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:506-11.
- Diaz JM, Sainz Z, Guirado LL, Ortiz-Herbener F, Picazo M, Garcia-Camin R, Palou J, Alcaraz A, Sola R. Risk factors for cardiovascular disease after renal transplantation. *Transplant Proc*. 2003 Aug;35(5):1722-4.
- Dimèny E, Hultberg B et al. Serum total homocysteine does not predict outcome in renal transplant recipients. *Transplantation* 1998; 12:563-8.
- Donger C, Georges JL et al. New polymorphisms in the interleukin-10 gene relationships to myocardial infarction. *Eur J Clin Invest* 2001; 31:9.

- Ducloux D, Fournier V et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients with and without cyclosporine. *Clin Nephrol* 1998; 49:232-35.
- Ducloux D, Fournier V et al. Mycophenolate mofetil in renal transplant recipients with cyclosporine-associated nephrotoxicity. *Transplantation* 1998; 65:1504-8.
- El-Amm JM, Haririan A, Crook ED. The effects of blood pressure and lipid control on kidney allograft outcome. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6(1):1-7.
- El-Ghar SM, Qureshi M et al. Oxidative stress in renal transplant patients who develop cardiovascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2006 Sep;11(3):203-10.
- Fellstrom B. Impact and management of hyperlipidemia posttransplantation. *Transplantation*. 2000 Dec 15;70(11 Suppl):SS51-7.
- Fernandes JB, Naik UP et al. Comparative investigation of the effects of the immunosuppressants cyclosporine A, cyclosporine G, and FK-506 on platelet activation. *Cell Mol Biol Res*. 1993;39(3):265-74.
- Fodinger M, Wolf G et al. Effect of MTHFR 677 C>T on plasma total homocysteine levels in renal graft recipients. *Kidney Int* 1999; 55:1072-80.
- Frishman WH. Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998; 140:S18-27.
- Frosst P, Blom HJ et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995 May;10(1):111-3.
- Fuggle SV, Koo DDH. Cell adhesion molecules in clinical renal transplantation. *Transplantation* 1998; 65:763-9.
- Gelens MA, Christiaans MH, v Hooff JP. Do blood pressure and arterial wall properties change after conversion from cyclosporine to tacrolimus? *Transplant Proc*. 2005 May;37(4):1900-1.
- Gorak-Stolinska P, Truman JP et al. Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha. *J Leukoc Biol*. 2001 Nov;70(5):756-66.
- Grainger DJ, Heathcote K et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor  $\beta$ 1. *Hum Mol Genet* 1999; 8:93.
- Grainger DJ, Kemp PR et al. The serum concentration of active transforming growth factor  $\beta$  is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1995; 1:74.
- Hagen W, Fodinger M et al. Effect of MYHFR genotypes and hyperhomocysteinemia on patient and graft survival in kidney transplant recipients. *Kidney Int Suppl* 2001, 78:S253-7.
- Hahn AB, Kasten-Jolly JC, et al. TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ , and IL-10 gene expression polymorphisms and the IL-4 receptor  $\alpha$ -chain variant Q576R: effect on renal allograft outcome. *Transplantation* 2001; 72(4):660-5.
- Hegyi L, Hardwick SJ et al. Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J Hematother Stem Cell Res*. 2001 Feb;10(1):27-42.
- Hirano A, Nagai H et al. Two novel single-nucleotide polymorphisms of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes Immun*. 2001 Apr;2(2):117-8.

- Hjelmsaeth J, Hartmann A et al. Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age. *Transplantation*. 1997 Oct 15;64(7):979-83.
- Hjelmsaeth J, Hartmann et al. Metabolic cardiovascular syndrome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 May;16(5):1047-52.
- Hoffmann S, Park J et al. Donor genomics influence graft events: The effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2004; 64:1686-1693.
- Holmberg A, Sandhagen B, Bergqvist D. Hemorheologic variables in critical limb ischemia before and after infrainguinal reconstruction. *J Vasc Surg*. 2000 Apr;31(4):691-5.
- Huang QR, Morris D, Manolios N. Identification and characterization of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol*. 1997 Jun;34(8-9):577-82.
- Hull J, Ackerman et al. Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):413-9.
- Hutchings A, Guay-Woodford L et al. Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients. *Pediatr Transplant* 2002; 6:69-77.
- Ilkay E, Tirikli L et al. Oral mycophenolate mofetil prevents in-stent intimal hyperplasia without edge effect. *Angiology*. 2006 Oct-Nov;57(5):577-84
- Irish A. Hypercoagulability in renal transplant recipients. Identifying patients at risk of renal allograft thrombosis and evaluating strategies for prevention. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2004;4(3):139-49.
- Johnson RW, Kreis H et al. Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure. *Transplantation* 2001; 72:777-86.
- Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988; 84:995-9.
- Kasiske BL. Role of circulating lipid abnormalities in chronic renal allograft rejection. *Kidney Int Suppl*. 1999 Jul;71:S28-30.
- Kasiske BL, Klinger D. Cigarette smoking in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:753-9.
- Kasiske BL, Snyder JJ et al. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2003 Feb;3(2):178-85.
- Keane WF. Derangement of lipid metabolism and its management in renal transplant patients. *Miner Electrolyte Metab*. 1997;23(3-6):166-9.
- Keso T, Perola M et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2001; 154:691.
- Kirkpantur A, Kahraman et al. The effects of maintenance recombinant human erythropoietin therapy on ambulatory blood pressure recordings: conventional, Doppler, and tissue Doppler echocardiographic parameters. *Artif Organs*. 2005 Dec;29(12):965-72.
- Koch W, Kastrati A et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 159:137.

- Krammer P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407:789-795.
- Kubota T, Mc Namara DM et al. Effects of tumor necrosis factor gene polymorphisms on patients with congestive heart failure. *Circulation* 1998; 97:2499.
- Lacour B, Parry C et al. Pyridoxal 5-phosphate deficiency in uremic undialyzed, hemodialyzed and non-uremic kidney transplant patients. *Clin Chim Acta* 1983; 127:205-15.
- Lafontan M, Arner P. Application of in situ microdialysis to measure metabolic and vascular responses in adipose tissue. *Trends in Pharmacological Science* 1996; 17:309-313.
- Lee DM, Knight-Gibson C et al. Lipoprotein particle abnormalities and the impaired lipolysis in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2002 Jan;61(1):209-18.
- Levin A. Anemia and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease populations: A review of the current state of knowledge. *Kidney Int* 2002; 64; S35-41.
- Li B, Hartono et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001 Mar 29;344(13):947-54.
- Li F, Yin M et al. Cytomegalovirus infection enhances the neointima formation in rat aortic allografts. *Transplantation* 1998; 65:1298-304.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- Lindholm A, Albrechtsen D et al. Ischemic heart disease--major cause of death and graft loss after renal transplantation in Scandinavia. *Transplantation.* 1995 Sep 15;60(5):451-7.
- Longenecker JC, Coresh J et al. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1918-27.
- Luoviksson BR, Gunnlaugsdóttir B. Transforming growth factor- $\beta$  as a regulator of site-specific T-cell inflammatory response. *Scandinavian journal of immunology* 2003; 58:129-138.
- MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004 Jul;5(7):674-8.
- Majumdar A, Wheeler DC. Lipid abnormalities in renal disease. *J R Soc Med.* 2000 Apr;93(4):178-82.
- Marcucci R, Zanazzi M et al. Vitamin supplementation reduces the progression of atherosclerosis in hyperhomocysteinemic renal-transplant recipients. *Transplantation* 2003; 75:1551.
- Marshall SE, McLaren AJ et al. The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2000; 70:1485-91.
- Marshall SE, McLaren AJ et al. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71(3):469-476.
- Massy ZA, Chadeaux-Vekemans B et al. Hyperhomocysteinemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:1103-8.
- Massy ZA. Hyperlipidemia and cardiovascular disease after organ transplantation. *Transplantation.* 2001 Sep 27;72(6 Suppl):S13-5.



- Matas AJ, Humar et al. Five preventable causes of kidney graft loss in the 1990s: a single-center analysis. *Kidney Int.* 2002 Aug;62(2):718-9.
- Matl I, Lacha J et al. Withdrawal of steroids from triple-drug therapy in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2000 Jul;15(7):1041-5.
- McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56:111-28.
- Meier-Kriesche HU, Baliga R, Kaplan B. Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation. *Transplantation.* 2003 Apr 27;75(8):1291-5.
- Midtvedt K, Neumayer HH. Management strategies for posttransplant hypertension. *Transplantation.* 2000 Dec 15;70(11 Suppl):SS64-9.
- Miles AM, Markell MS et al. Anemia following renal transplantation: erythropoietin response and iron deficiency. *Clin Transplant.* 1997 Aug;11(4):313-5.
- Miller LW, Granville DJ et al. Apoptosis in cardiac transplant rejection. *Cardiol Clin.* 2001 Feb;19(1):141-54.
- Misefari V. HLA: immunogenetica e applicazioni in medicina. Edizioni SIMTI 2001.
- Misiakos EP, Kouraklis G, Agapitos E, Perrea D, Karatzas G, Boudoulas H, Karayannakos PE. Expression of PDGF-A, TGF $\beta$  and VCAM-1 during the developmental stages of experimental atherosclerosis. *Eur Surg Res.* 2001 Jul-Aug;33(4):264-9.
- Mizia-Stec K, Mandecki T et al. Is there a relationship between left ventricular systolic function and serum cytokines level in patients with coronary artery disease? *Med Sci Monit* 2002; 8:87.
- Montanaro D, Gropuzzo M et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce hemoglobin concentrations, hematocrit, and serum erythropoietin levels in renal transplant recipients without posttransplant erythrocytosis. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):2038-40.
- Mulay AV, Cockfield S, Stryker R, Fergusson D, Knoll GA. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus for chronic renal allograft dysfunction: a systematic review of the evidence. *Transplantation.* 2006 Nov 15;82(9):1153-62.
- Mullauer L et al. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res.* 2001 Jul;488(3):211-31.
- Muller-Steinhardt M, Hartel C et al. The interleukin-6 -174 promoter polymorphisms is associated with long term kidney allograft survival. *Kidney Int* 2002; 71:469-476.
- Muthukumar T, Ding R et al. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003; 75:1565-1570.
- Nieminen MS, Mattila K, Valtonen V. Infection and inflammation as risk factors for myocardial infarction. *Eur Heart J* 1993; 14:S12-6.
- Ojo AO, Hanson JA et al. Long-term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int.* 2000 Jan;57(1):307-13.
- Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int.* 1998 Jan;53(1):217-22.

- Ott U, Aschoff A et al. DNA fragmentation in acute and chronic rejection after renal transplantation. *Transplant Proc.* 2007 Jan-Feb;39(1):73-7.
- Park JM, Luan FL. Management of hypertension in solid-organ transplantation. *Prog Transplant.* 2005 Mar;15(1):17-22.
- Perez Fernandez R, Kaski JC. Interleukin-10 and coronary disease. *Rev Esp Cardiol.* 2002 Jul;55(7):738-50.
- Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC et al. IL-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2823.
- Plaza DM, Fernandez D. Cytokine gene polymorphisms in heart transplantation: association of low IL-10 production genotype with Quilty effect. *J Heart Lung Transplant.* 2003 Aug;22(8):851-6.
- Pravica V, Asderakis A et al. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. *Eur J Immunogenet* 1999; 26:1-3.
- Pravica V, Perrey C et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 2000;61:863-6.
- Ratcliffe PJ, Dudley CR et al. Randomised controlled trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients receiving triple immunosuppression. *Lancet* 1996; 348:643-46.
- Rattazzi M, Puato M et al. New markers of accelerated atherosclerosis in end-stage renal disease. *J Nephrol.* 2003 Jan-Feb;16(1):11-20.
- Ridker PM, Rifai N et al. Elevation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000; 101:2149.
- Rigatto C, Parfrey P et al. Congestive heart failure in renal transplant recipients: risk factors, outcomes, and relationship with ischemic heart disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Apr;13(4):1084-90.
- Ritz E, Schwenger V et al. Atherosclerotic complications after renal transplantation. *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1:S14-9.
- Romagnoli J, Citterio F et al. Incidence of posttransplant diabetes mellitus in kidney transplant recipients immunosuppressed with sirolimus in combination with cyclosporine. *Transplant Proc.* 2006 May;38(4):1034-6.
- Romero F, Rodriguez-Iturbe B et al. Mycophenolate mofetil treatment reduces cholesterol-induced atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis.* 2000 Sep;152(1):127-33.
- Ross R. Atherosclerosis. An Inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
- Ruilope LM, Salvetti A et al. Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of the hypertension optimal treatment (HOT) study. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Feb;12(2):218-25.
- Sankaran D, Asderakis A et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney international* 1999; 56:281-288.
- Sarnak MJ, Levey AS et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure

Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003 Oct 28;108(17):2154-69.

- Sarnak MJ, Tighiouart H et al. Anemia as a risk factor for cardiovascular disease in The Atherosclerosis Risk Communities (AIRC) study. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:27-54.
- Sartori MT, Rigotti P et al. Plasma fibrinolytic capacity in renal transplant recipients: effect of steroid-free immunosuppression therapy. *Transplantation*. 2003 Apr 15;75(7):994-8.
- Schroecksnadel K, Frick B, Winkler C, Fuchs D. Crucial role of interferon-gamma and stimulated macrophages in cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 2006 Jul;4(3):205-13.
- Shan X, Wang L et al. Functional Characterization on Human Methylenetetrahydrofolate Reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1999 Nov 12;274(46):32613-8.
- Sharma VK, Bologa RM et al. Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney international* 1996; 49 (5):1297-1303.
- Shimmura H, Tanabe K et al. Analysis of cause of death with a functioning graft: a single-center experience. *Transplant Proc*. 2004 Sep;36(7):2026-9.
- Solez K. International standardization of criteria for histologic diagnosis of chronic rejection in renal allograft. *Clin Transplant* 1994; 8:345-50.
- Stefoni S, Cianciolo G al. Low TGF-β1 serum levels are a risk factor for atherosclerosis disease in ESRD patients. *Kidney Int* 2002; 61:324.
- Sutherland WH, Walker RJ et al. Oxidation of low density lipoproteins from patients with renal failure or renal transplants. *Kidney Int*. 1995 Jul;48(1):227-36.
- Tamura K, Fujimura T et al. Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic b cell. *Transplantation* 1995; 59:1606-13.
- Tashiro H, Shimokawa H et al. Altered plasma levels of cytokines in patients with ischemic heart disease. *Coron Artery Dis* 1997; 8:143.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
- Turner DM, Williams DM et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24:1.
- Verpooten GA, Cools FJ et al. Elevated plasminogen activator inhibitor levels in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:347-51.
- Viklický O, Hubáček JA et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase T677 allele with development of chronic allograft nephropathy. *Clin Biochem* 2004;37:919-924.
- Watanabe N, Arase H et al. Th1 and Th2 subsets equally undergo Fas-dependent and -independent activation-induced cell death. *Eur J Immunol*. 1997 Aug;27(8):1858-64.
- Wilcken DEL, Gupta VJ, Betts AK. Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: effects of cofactors for methionine metabolism. *Clin Sci* 1981; 61:743-9.

- Wilson AG, Symons JA et al. Effects of a polymorphism in human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:3195-9.
- Wilson PW, D'Agostino RB et al. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation. 1998 May 12;97(18):1837-47.

Le analisi biologico-molecolari e biochimiche sono state eseguite presso i Laboratori dell'U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto del Policlinico Universitario S. Orsola di Bologna diretta dal Prof. Sergio Stefoni.

Le indagini biochimico-cliniche di base sono state eseguite presso l'U.O. Laboratorio Centralizzato del Policlinico Universitario S. Orsola diretto dalla D.ssa Paola Boni.

## 8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Sergio Stefoni che in questi anni fondamentali per la mia vita lavorativa e personale mi ha onorato della sua fiducia ed ha rappresentato un insostituibile Maestro nell'approccio scientifico e metodologico.

Ringrazio il mio Tutor, la Prof.ssa Maria Piera Scolari, per l'enorme disponibilità e l'appoggio, beni preziosi che non mi ha mai negato durante la realizzazione di questa tesi.

Un grazie al Prof. Gaetano La Manna la cui dedizione infaticabile al lavoro costituirà sempre un esempio ed un punto di riferimento per me.

Vorrei ringraziare anche tutte le persone che hanno permesso lo svolgimento di questa tesi: il Dr. Giuseppe Cianciolo, la D.ssa Giorgia Comai e la D.ssa Laura Panicali per avermi aiutato con le loro competenze mediche e cliniche nei sentieri in cui la mia cultura prevalentemente biologica mi impediva di inoltrarmi.

Ringrazio la D.ssa Serena Corsini per il suo prezioso supporto in alcune fasi *critiche* della ricerca ed i colleghi biologi Dr. Luigi Carlo Borgnino, D.ssa Diletta Conte e D.ssa Nicole Lanci che ogni giorno contribuiscono con la loro presenza e la loro amicizia a rendere piacevole il lavoro di laboratorio.

Vorrei anche esprimere tutta la mia gratitudine a tutto il personale della Nefrologia, strutturato e non strutturato, medico ed infermieristico, per l'apporto che ciascuno ha saputo dare nel creare un ambiente di collaborazione ed "empatia".

Un ringraziamento particolare va ai miei colleghi Dottorandi: Dr. Paolo Maiorca, D.ssa Francesca Bianchi e D.ssa Francescaromana Festuccia per la grande solidarietà che ci ha consentito di arrivare insieme alla fine di questo Dottorato.

Vorrei ringraziare tutta la mia famiglia, per il sostegno e l'enorme affetto che non mi ha mai fatto mancare ed in particolare Nonno Ciccio, scomparso da poco, il cui orgoglio e la cui fiducia mi hanno sempre incoraggiato ad andare avanti anche nei momenti più difficili. A lui dedico questa tesi.

Ringrazio anche i miei suoceri, Evio ed Elena, mio cognato Alessandro e Mosè per il calore con cui mi hanno accolto nella loro famiglia e per l'attenzione sempre mostrata verso il mio lavoro di biologa.

Infine, non posso che concludere queste pagine ringraziando Leonardo, senza il quale la parte più importante della mia vita non sarebbe neanche iniziata.