



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOMEDICINA

CURRICOLO: MEDICINA RIGENERATIVA

XXIX° CICLO

ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI GENETICI E RIGETTO ACUTO NEL PAZIENTE TRAPIANTATO DI RENE

Coordinatore: Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Co-Supervisore: Ch.mo Prof. Claudio Ronco

Dottoranda: Elisa Scalzotto

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	1
RIASSUNTO.....	3
SUMMARY.....	5
INTRODUZIONE.....	7
MALATTIA RENALE CRONICA.....	7
TRAPIANTO RENALE.....	12
RIGETTO E TERAPIE IMMUNOSOPPRESSIVE NEL TRAPIANTO RENALE ...	14
RIGETTO RENALE.....	14
TERAPIE IMMUNOSOPPRESSIVE.....	17
GENI CONNESSI CON IL RIGETTO ACUTO.....	21
INTERLEUCHINA-10 (IL-10).....	22
TUMOR NECROSIS FACTOR-ALFA (TNF-α).....	22
ATP Binding Cassette subfamily B member 1 (ABCB1)/ MultiDrug Resistance 1 (MDR1).....	23
UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9 (UGT1A9).....	23
IMP (inosina 5'-monofosfato) deidrogenasi 2 (IMPDH2).....	24
POLIMORFISMI GENETICI.....	24
OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	28
MATERIALI E METODI.....	29
1. Tipo di studio e arruolamento.....	29
2. Raccolta dei campioni e delle informazioni relative ai pazienti.....	30
3. Selezione dei polimorfismi nei geni target.....	30
4. Analisi genetica.....	30
4.1 Estrazione del DNA.....	31
4.2 Scelta dei primer.....	31
4.3 Amplificazione (PCR).....	33
4.4 Elettroforesi su gel di agarosio.....	34
4.5 Purificazione dei prodotti di PCR.....	34
4.6 Reazione di sequenza.....	34

4.7 Purificazione della reazione di sequenza.....	35
4.8 Corsa e lettura.....	35
5. Analisi statistica.....	36
RISULTATI.....	37
DISCUSSIONE.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	50

ABBREVIAZIONI

ABC	ATP Binding Cassette
ABCB1/MDR1	ATP Binding Cassette subfamily B member 1/MultiDrug Resistance 1
ABMR	Acute/active Antibody-Mediated Rejection
APC	Antigen Presenting Cells
ATP	Adenosina Trifosfato
AZA	Azatioprina
DS	Standard Deviation
CARHES	Cardiovascular Risk in Renal patients of the Health Examination Survey
CD4	Cluster of Differentiation 4
CKD	Chronic Kidney Disease
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CNV	Copy Number Variation
CsA	Ciclosporina
CTS	Collaborative Transplant Study
eGFR	estimated Glomerular Filtration Rate
ESRD	End-Stage Renal Disease
FKBP-12	FK-Binding Protein 12
HET	Eterozigosità
IL-10	Interleuchina 10
IMPDH2	Inosina 5'-Monofosfato Deidrogenasi 2

IQR	InterQuartile Range
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
NF-AT	Fattori Nucleari delle cellule T Attivate
NHANES III	National Health and Nutrition Examination Survey III
NF-KB	Nuclear Factor Kappa-light-chain enhancer of activated B cells
NKF-K/DOQI	National Kidney Foundation - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MMF	Micofenolato mofetile
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short Tandem Repeat
TAC	Tacrolimus
TCMR	Acute T cell-Mediated Rejection
6-TGN	6-Tioguanina Nucleotide
Th	T helper
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
UGT1A9	UDP GlucuronosylTransferase 1 family, polypeptide A9
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

RIASSUNTO

Il trapianto di rene rappresenta il trattamento di elezione per i pazienti affetti da insufficienza renale terminale ESRD, GFR < 15 ml/min/1,73 m²). In un certo numero di casi il decorso può essere complicato da processi patologici che possono comportare la compromissione fino alla perdita del rene. Una delle complicanze post-trapianto è rappresentata dal rigetto, l'espressione clinica e/o istologica di un insufficiente controllo della risposta immune. Il rigetto acuto "classico" è di tipo interstiziale cellulo-mediato, ma può riconoscere anche una componente umorale. Per prevenire e trattare il rigetto è sempre necessario ricorrere alla terapia immunosoppressiva, riducendo al minimo la tossicità del farmaco e il rischio di sviluppare infezioni e neoplasie. Negli ultimi anni si è delineato sempre di più il concetto di "variabilità inter-individuale" nella risposta ai farmaci, dipendente da numerosi geni. Evidenze scientifiche riportano che alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) localizzati in geni coinvolti nella risposta immunitaria e nella farmacocinetica/farmacodinamica dei farmaci immunosoppressivi sono associati con il rigetto da allotrapianto nei pazienti trapiantati di rene. Sulla base della variabilità inter-individuale alla risposta a farmaci, sono stati scelti 5 geni: 2 noti per essere target della risposta immunitaria, IL-10 e TNF- α , e 3 geni target della terapia immunosoppressiva, ABCB1/MDR1, UGT1A9 e IMPDH2.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di determinare le possibili associazioni genetiche tra le 19 varianti polimorfiche (SNP) individuate nei geni e l'evento di rigetto acuto nei pazienti trapiantati renali.

Il protocollo di studio si è articolato in 5 fasi: arruolamento dei gruppi di studio (CASI: pazienti trapiantati con evento di rigetto acuto, CONTROLLO I: pazienti trapiantati senza alcun evento di rigetto acuto, CONTROLLO II: soggetti sani donatori di sangue), raccolta dei campioni di sangue, analisi molecolare degli SNPs di interesse e analisi statistica.

Sono stati arruolati 220 individui: 41 casi con età mediana di 50 anni (IQR: 42-62 anni); 109 pazienti trapiantati (gruppo Controllo I) con età mediana di 55 anni (IQR: 48-62 anni) e 70 soggetti sani (gruppo Controllo II) con età mediana di 49 anni (IQR: 41-54 anni). Confrontando le variabili sesso ed età al prelievo abbiamo trovato una differenza statisticamente significativa nei tre gruppi ($p=0,0028$ e $p=0,0123$, rispettivamente). Le frequenze alleliche osservate sono distribuite in modo omogeneo all'interno dei gruppi studiati e sovrapponibili a quelle riportate per la popolazione europea e mondiale (Ensembl), indicando che la popolazione di controlli sani è rappresentativa. Per

tutti gli SNPs appartenenti al gene IMPDH2, ad eccezione dell'rs11706052, vi è la presenza di un locus monoallelico. Questo è confermato dai dati aggiornati recentemente e presenti nel database mondiale (Ensembl) e da alcuni studi suggerendo la presenza di artefatti dovuti al sequenziamento effettuato con metodi meno sofisticati. Tutti i polimorfismi risultano in equilibrio di Hardy-Weinberg ad eccezione dello SNP rs1045642 appartenente al gene ABCB1/MDR1. È stata effettuata l'analisi *per-allele*, *per-genotype* e *linear trend* per tutti i polimorfismi nei tre gruppi studiati: confrontato il gruppo di tutti i pazienti trapiantati (Casi + Controllo I) con gli individui sani è emerso che i pazienti con il genotipo G/G relativo allo SNP rs1800872 del gene IL10 potrebbero, con maggiore probabilità, andare incontro a malattia renale cronica (CKD).

I pazienti che presentano l'allele C nello SNP rs1045642 e l'allele A nello SNP rs2032582, entrambi appartenenti al gene ABCB1/MDR1, hanno una maggiore suscettibilità a sviluppare eventi avversi in seguito al trapianto. Dal momento che questo gene codifica per una pompa di efflusso transmembrana, in grado di estromettere numerosi composti xenobiotici, compresi i farmaci immunosoppressivi, è facile pensare che le varianti polimorfiche possano modificare l'efficacia della pompa alterando dunque il successo della terapia farmacologica. Di conseguenza, lo screening di questi SNPs prima del trapianto potrebbe aiutare il clinico a sviluppare una terapia immunosoppressiva personalizzata.

Solo l'aumento della numerosità campionaria, così da raggiungere il numero di individui previsto dal *sample size test* (69 per gruppo), permetterà di verificare questi risultati e avvalorare questa ipotesi.

SUMMARY

Following kidney transplantation one of the most frequent complications is acute rejection, defined by certain clinical characteristics and histological evidence of insufficient control of the immune response. Genetic variability offers a possible explanation for the inter-individual differences on the clinical course post-transplant. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in genes involved in immune responses and in the pharmacokinetics/pharmacodynamics of immunosuppressive drugs are associated with allograft rejection. Therefore in this study key SNPs in specific target genes were analysed in kidney transplant recipients:

- 3 SNPs related to drug transporter ABCB1/MDR-1 (or permeability glycoprotein), that influences the pharmacokinetics of the immunosuppressant calcineurin inhibitors, like Tacrolimus
- 10 SNPs connected to Inosine MonoPhosphate DeHydrogenase (IMPDH2), direct target of the immunosuppressive mycophenolic acid (MPA)
- 4 SNPs in the MPA metabolizing Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) enzyme
- 1 SNP in the proinflammatory cytokine Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) and
- 1 SNP in the anti-inflammatory cytokine Interleukin-10 (IL-10) gene.

Our aim is to determine the SNPs profiles of five important genes associated with the acute rejection event in kidney transplant patients.

The study protocol is the following: recruitment in study groups, blood sample and clinical data collection, molecular analysis of 19 SNPs, statistical analysis.

Currently, a total number of 220 individuals are included in our study: 41 transplant patients with acute rejection in the Case, 109 transplant patients without acute rejection in the Control I and 70 healthy blood donors in the Control II group. Analyzing the clinical characteristics there are statistically significant differences regarding the gender ($p = 0.0028$) and the age ($p = 0.0123$) distribution between the three experimental groups. Individuals in the Control II group were little younger than in the two other groups (Case: 50 (42-62) vs Control I: 55 (48-62) vs Control II: 49 (41-54)). In our study more male (103) patients needed transplantation than female (47) patients. Moreover this gender difference is also noted when acute rejection happens (36 male vs 5 female

cases).

The observed allele frequencies are in line with ones reported from Europe indicating that the studied population in the Control II group is representative.

Our results show that all SNPs for IMPDH2, with the exception of rs11706052, are not polymorphic. Other groups have published similar results hypothesizing that those SNPs found in public, online databases (Ensembl) are artefacts of previous, not so accurate sequencing techniques. All polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium, except the rs1045642 of ABCB1 in the Case group.

Analysis of allele and genotype frequencies and trend test were performed between Case vs Control I; Transplant group (Case+Control I) vs Control II; Case vs Control II. Comparing the group of all transplant patients and healthy individuals, our result is suggesting that a G/G genotype of rs1800872 belonging to IL10 gene more probably leads to chronic kidney disease (CKD), as it has been shown in previous works.

Patients holding a C allele in rs1045642 or an A in rs2032582, both SNPs of ABCB1, are more prone to develop an adverse event after transplantation. Since ABCB1 is a drug efflux pump, SNPs modifying the effectiveness of the pump may compromise the success of the immunosuppressive therapy or lead to cytotoxicity.

Thus, screening for ABCB1 polymorphisms rs1045642 and rs2032582 before transplantation would help clinicians to better personalize therapy.

However, all calculations need to be repeated after reaching the adequate number of patients estimated with the sample size test (69 patients/group) to correctly verify our results. The molecular analysis of the missing samples is in progress thanks for a collaboration with the Department of Nephrology in Udine.

INTRODUZIONE

MALATTIA RENALE CRONICA

La **malattia renale cronica** (*Chronic Kidney Disease, CKD*) è definita come l'insieme eterogeneo di anomalie strutturali e funzionali a carico del rene che comportano una riduzione progressiva delle funzioni renali (tra cui escretoria, endocrina e metabolica). La *National Kidney Foundation - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-K/DOQI) ha definito CKD) come la presenza di **danno renale** o diminuita funzione renale per **tre o più mesi**, indipendentemente dalla causa. La persistenza del danno o della funzione diminuita per almeno tre mesi è necessaria per distinguere CKD dalla malattia renale acuta [1,2].

I dati epidemiologici derivati dalla *National Health and Nutrition Examination Survey III* (NHANES III) dimostrano che la CKD è una patologia molto diffusa nel mondo, con una prevalenza crescente nella popolazione generale.

I motivi di questo incremento, da alcuni sistemi sanitari definito come “epidemico”, sono numerosi:

- l'invecchiamento della popolazione contribuisce a far emergere un numero crescente di soggetti con riduzione della funzione renale, anche solo come conseguenza fisiologica legata all'“invecchiamento del rene” (*ageing kidney*);
- l'aumentata prevalenza nella popolazione generale di condizioni cliniche caratterizzate da un elevato rischio di manifestare un danno renale, (quali il diabete mellito di tipo II, la sindrome metabolica, l'ipertensione arteriosa, l'obesità, la dislipidemia) e l'aumentata sopravvivenza dei pazienti;
- la maggiore attenzione che viene posta alla diagnosi di tale patologia, facilitata dalla disponibilità di strumenti diagnostici semplici, affidabili e di basso costo;
- la mortalità competitiva, legata all'aumento della vita media e a terapie che risolvono situazioni critiche.

La definizione e la stadiazione della malattia renale cronica è stata proposta dalla *National Kidney Foundation - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF - KDOQI) degli Stati Uniti d'America nel 2002, poi modificata da: *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) nel 2004.

Si definisce come CKD la condizione in cui sia presente da almeno 3 mesi:

- 1) una riduzione della Velocità di Filtrazione Glomerulare stimata (*estimated Glomerular Filtration Rate*) al di sotto di 60 ml/min/1,73 m² determinata attraverso le equazioni *Modification of Diet in*

Renal Disease (MDRD), o *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI), oppure

2) presenza di un danno renale, anche in assenza di un eGFR < 60 ml/min/1,73 m². Il danno renale dev'essere documentato da una biopsia renale, , oppure dalla presenza di *markers* ematici o urinari di danno renale, quali ad es.

- a. proteinuria (vedi allegato 1 per la definizione),
- b. alterazioni del sedimento urinario (presenza di microematuria/macroematuria non secondaria a patologie urologiche, cilindri ematici, leucocitari, o grassosi, corpi ovali grassosi, cilindri granulari e cellule epiteliali tubulari, etc.),
- c. alterazioni ai test di diagnostica per immagini del rene (ecografia, TAC, scintigrafia, RMN, etc. con reperto di rene policistico, idronefrosi, cicatrici, masse, stenosi dell'arteria renale, etc).

La stadiazione di CKD prevede 5 stadi progressivi, valutati attraverso la eGFR (Tabella 1). La letteratura internazionale ci indica che lo stadio 3 è quello nel quale si evidenzia una tendenza alla progressione più o meno rapida verso un deficit funzionale sempre maggiore: stadi 4 e 5 fino alla dialisi. Una revisione della classificazione del KDOQI divide lo stadio 3 in due sottogruppi: 3a (eGFR tra 59 e 45) e 3b (eGFR tra 44 e 30).

Lo stadio 3b dovrebbe essere controllato e trattato in maniera intensiva, rappresentando un gruppo di pazienti ad alto rischio di complicanze della malattia renale e della sua evoluzione verso gli stadi terminali [3,4].

La stadiazione della CKD deve tenere conto sia del valore della eGFR , che della presenza di proteinuria/albuminuria. Si distinguono, quindi, tre gradi di albuminuria (Tabella 2), che si combinano con uno degli stadi di eGFR (G); gli stadi G1-A1 e G2-A1 sono stadi di rischio basso, per peggiorare progressivamente fino a G5-A3 (Figura 1) La stadiazione così effettuata corrisponde a diversi gradi di rischio di mortalità e di evoluzione della CKD verso il trattamento sostitutivo mediante dialisi o trapianto. Va sottolineato che comunque livelli più rilevanti di proteinuria si associano ad una progressione più veloce verso lo stadio terminale della malattia renale cronica

STADIO	DESCRIZIONE del danno renale	GFR (ml/min/1,73 m ²)
1	Funzione normale o aumentata	>90
2	Lieve compromissione funzionale	89-60
3a	Compromissione funzionale da lieve a moderata	59-45
3b	Compromissione funzionale da moderata a grave	44-30
4	Compromissione funzionale grave	29-15
5	Insufficienza renale terminale o uremia	<15 (o paziente in terapia sostitutiva)

Tabella 1. Classificazione della CKD

STADIO	ALBUMINURIA
A1	≤30 mg/g creatininuria
A2	31-300 mg/g creatininuria
A3	≥300 mg/g creatininuria

Tabella 2. Classificazione della albuminuria in base alla creatininuria

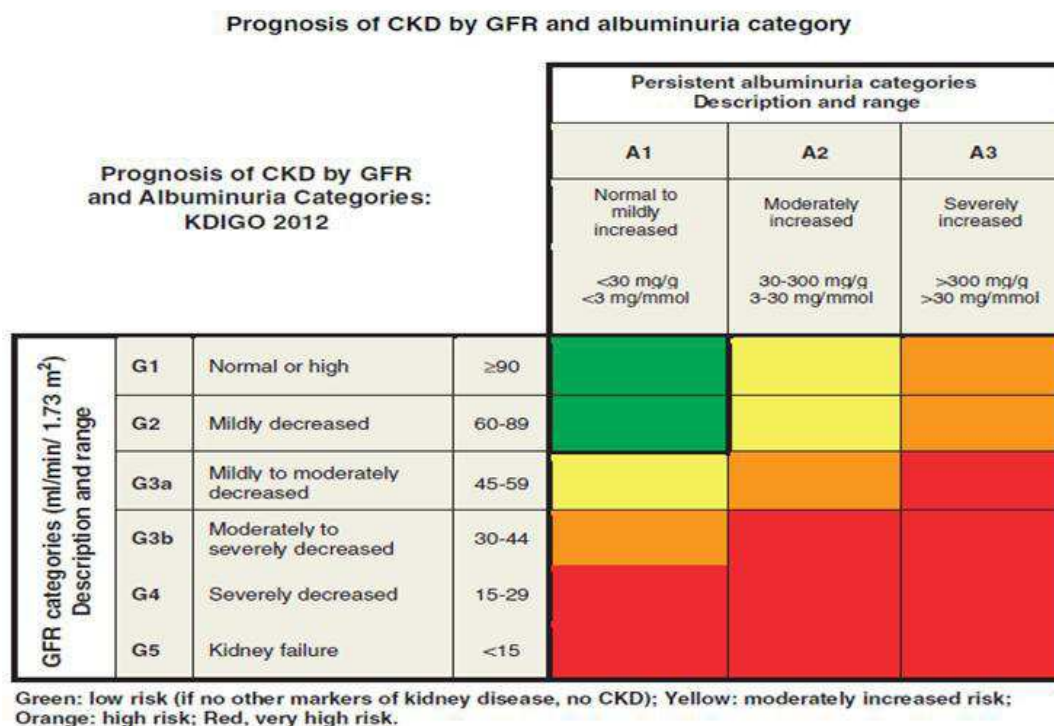


Figura 1. Gradi di rischio di mortalità ed evoluzione della CKD

Di recente, lo STUDIO *Cardiovascular Risk in Renal patients of the Health Examination Survey* (CARHES) della Società Italiana di Nefrologia, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità e l'Associazione Nazionale Medici Cardiologi Ospedalieri, ha reso disponibili i dati sulla

prevalenza di CKD nel 2010 su scala nazionale. La **prevalenza di CKD** (GFR <60 e/o Ualb/Ucreat ≥ 30 mg/g) è risultata del 7,5% negli uomini e 6,5% nelle donne con un'incidenza maggiore ($\pm 60\%$) negli stadi iniziali 1 e 2 della CKD, rispetto agli stadi 3-5 (40%) [5-8].

La CKD può evolvere verso l'**insufficienza renale terminale (eGFR, end Stage Renal Disease)**, intesa come la perdita progressiva e irreversibile della funzione renale (eGFR < 15 ml/min/1,73 m²), che richiede un trattamento sostitutivo rappresentato dalla dialisi o dal trapianto di rene. La riduzione della funzione renale e quindi il decremento della eGFR determinano una **minore efficienza nell'eliminazione delle sostanze organiche di rifiuto** dall'organismo, che a loro volta tendono ad accumularsi, determinando il quadro clinico denominato genericamente **uremia** (accumulo di scorie azotate tra cui urea, composti guanidinici, amine alifatiche, acido urico, ecc.). Durante l'evoluzione della CKD si assiste ad un **progressivo decremento del numero di nefroni funzionanti**. Quelli che restano attivi vanno incontro ad ipertrofia, per mantenere invariato l'eGFR. La conseguenza quindi, oltre alla riduzione della massa nefrosica, è un meccanismo di usura dei nefroni funzionanti [8].

Durante le fasi iniziali dell'ESRD il paziente presenta scarsi sintomi clinici, e la disfunzione renale rimane silente e viene generalmente scoperta soltanto attraverso esami di laboratorio di routine. Nell'insufficienza renale avanzata il quadro clinico si complica, in particolare dal 3° stadio. I segni e sintomi che possono orientare alla diagnosi di uremia sono:

- Alterazione della sensazione di benessere;
- Crampi muscolari frequenti;
- Difficoltà di concentrazione;
- Inappetenza, nausea e vomito;
- Insonnia, apatia e irritabilità;
- Dispnea e rantoli all'auscultazione;
- Prurito e rash cutanei;
- Senso di affaticamento persistente, astenia;
- Alterazione della diuresi: poliuria e nocturia.

Nella fase terminale della malattia vengono interessati, oltre ai reni, diversi organi e apparati: apparato cardiovascolare, apparato respiratorio, sistema ematopoietico, sistema nervoso, apparato gastroenterico, sistema scheletrico [8,9].

Il trattamento dell'ESRD prevede due tipologie di terapie:

Terapie conservative: insieme di misure terapeutiche che si compongono in trattamenti nutrizionali e farmacologici, con il fine di ritardare la progressione, prevenire e trattare le complicanze, con lo scopo di preparare il paziente alle eventuali terapie sostitutive [9].

Terapie sostitutive: Quando il trattamento medico conservativo non è più in grado di assicurare uno stato accettabile di benessere o di correggere complicanze potenzialmente fatali, la dialisi e il trapianto renale costituiscono la terapia dell'ESRD allo stato terminale. Se non è possibile il trapianto di rene, che rappresenta la vera e completa sostituzione della funzione renale, la sopravvivenza del paziente può essere garantita solo dalla terapia dialitica.

Le tecniche dialitiche sono classificabili in due tipi fondamentali: l'emodialisi e la dialisi peritoneale.

L'**Emodialisi** o **dialisi extracorporea** rappresenta la tecnica maggiormente utilizzata per il trattamento dell'insufficienza renale terminale. Consiste in tre sedute la settimana della durata media di 4 ore, durante la quale l'apparato circolatorio è connesso ad un circuito extracorporeo dove avviene il processo depurativo [9]. Tutto il processo viene eseguito grazie all'ausilio di una macchina di dialisi chiamata comunemente "rene artificiale". L'accesso al torrente ematico avviene generalmente attraverso una fistola artero-venosa. Nei casi in cui l'allestimento sia difficoltoso vengono utilizzati una protesi o un catetere. Il sangue prelevato dal paziente viene pompato attraverso un circuito extracorporeo collegato allo strumento, e fatto scorrere all'interno di un filtro. Quest'ultimo è suddiviso in un compartimento ematico costituito da un fascio di fibre cave, le quali fungono da membrana semipermeabile filtrante, e dal compartimento del dialisato. Dopodiché il sangue viene re-infuso nel paziente stesso [10].

La **dialisi peritoneale** utilizza come membrana dializzante il peritoneo. La soluzione dialitica è immessa e drenata dalla cavità peritoneale attraverso un catetere posizionato nel sottocute sotto-ombelicale. La depurazione avviene fondamentalmente per diffusione. Con questa tecnica si possono sottrarre sia le sostanze di scarto presenti nel sangue che i liquidi in eccesso, dal momento che il peritoneo è ricco di capillari e arterie. Una volta trascorso il tempo previsto per la depurazione, il liquido di dialisi viene rimosso e sostituito con liquido pulito. Questa tecnica permette la de-ospedalizzazione del paziente ed è indicata anche per soggetti anziani o che presentano altre patologie oltre a quella renale. Una complicanza legata a questo tipo di dialisi è la possibilità di infezione del peritoneo.

TRAPIANTO RENALE

Il trapianto renale rappresenta il trattamento di elezione per i pazienti ESRD. Inoltre costituisce l'unica opzione terapeutica che ripristina integralmente nell'uremico cronico la funzione renale sia depurativa che endocrina. Ad oggi il trapianto di rene offre una aspettativa di vita molto elevata e una qualità di vita superiore agli altri trattamenti (Figura 2).

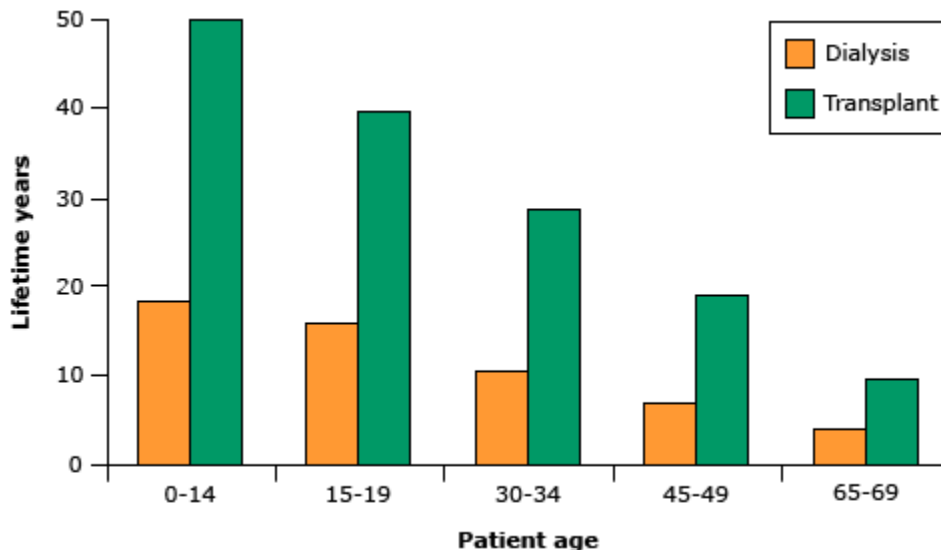


Figura 2: aspettativa di vita per pazienti con ESRD in rapporto a terapia dialitica (dialisi/trapianto) ed età (NAPRTCS del 2011)

Non tutti i pazienti con ESRD possono ricevere un trapianto renale. A tal proposito, sono state definite una serie di linee guida internazionali, basate su evidenze scientifiche, volte a guidare il clinico nel processo di valutazione pre-trapianto, fino al giudizio finale di idoneità [8,11,12].

In seguito agli accertamenti pre-trapianto il candidato viene ritenuto idoneo al trapianto. Il paziente candidato al trapianto da cadavere viene inserito nella lista d'attesa e viene rivalutato periodicamente, fino all'individuazione di un potenziale donatore [8]. Per i candidati che ne presentano l'indicazione (circa il 30% degli uremici cronici), il trapianto renale permette sopravvivenze statisticamente superiori a quelle ottenute con la dialisi (con un rischio di morte ridotto del 60%) indipendentemente dall'età del paziente. Rispetto alle altre terapie sostitutive e a parità di età e altri fattori di rischio, il trapianto renale conferisce non solo un miglioramento della qualità di vita, delle relazioni sociali per i soggetti riceventi, e una minor incidenza dei costi delle cure per il sistema sanitario nazionale, ma permette anche di ottenere una più longeva aspettativa di vita [8,13].

Il trapianto consiste in un intervento chirurgico che si suddivide in 3 fasi: 1. prelievo di un rene sano da un donatore vivente o cadavere compatibile, 2. conservazione adeguata dell'organo fino all'ultima fase di 3. impianto nella parte anteriore dell'addome del paziente ricevente in sede extraperitoneale. Più precisamente il rene viene allocato nella fossa iliaca destra o sinistra, anastomizzando i vasi renali del donatore con i vasi iliaci esterni del ricevente e l'uretere del donatore con la vescica del ricevente [14,15].

Come già accennato l'intervento può essere eseguito attraverso due modalità:

Trapianto da donatore deceduto, del quale si sia accertata, nel corso di un ricovero in rianimazione, la cessazione totale e irreversibile della funzione cerebrale. I criteri per le modalità di accertamento e certificazione di morte sono riportate nel Decreto del Ministero della Salute 11 aprile 2008. Vanno distinte le donazioni da cadavere a cuore battente e donazioni da cadavere a cuore fermo; entrambe le forme permettono di ottenere una buona sopravvivenza a lungo termine dell'organo.

Trapianto da donatore vivente. Quest'ultima tipologia di trapianto permette sopravvivenze del rene statisticamente superiori a quelle ottenute con il donatore deceduto (86% contro 76%) soprattutto con i viventi imparentati. Tale conclusione è avvalorata dai dati del *Collaborative Transplant Study* (CTS), poiché sembra che nel trapianto da donatore vivente giochino in modo favorevole fattori HLA indipendenti (assenza di ischemia fredda, assenza dei danni indotti dalla morte cerebrale, perfette condizioni dell'organo, assente o breve permanenza in dialisi) [9].

In entrambi i casi i donatori vanno valutati in base alla loro compatibilità immunologica con il ricevente: compatibilità di gruppo ABO e dei 3 principali antigeni HLA (HLA-A, -B e -DR). Per questo prima di ogni trapianto si effettua un cross-match pretrapianto (o cross-reazione linfocitaria), che consiste nella valutazione della reazione tra siero del ricevente e linfociti B e T del donatore. Una positività indica la presenza di anticorpi preformati nel ricevente contro antigeni del donatore che possono dar luogo al rigetto iperacuto. Per avere una maggiore sensibilità rispetto a questo metodo si deve prediligere una tecnica citofluorimetrica [13].

Nel 2015 in Italia i trapianti di rene sono stati 1.877, rispetto agli anni precedenti sono risultati in aumento grazie agli interventi eseguiti da donatori viventi, i quali hanno raggiunto quota 301 (+50 rispetto al 2014, +74 rispetto al 2013 e +109 rispetto al 2012) [16].

Il paziente portatore di trapianto renale può andare incontro a delle complicanze:

- Infettive;
- Neoplastiche;
- Immunologiche.

In un certo numero di casi il decorso può essere complicato da processi patologici che possono comportare la compromissione fino alla perdita del rene ed, in minoranza dei casi, essere causa di morte per il ricevente.

RIGETTO E TERAPIE IMMUNOSOPPRESSIVE NEL TRAPIANTO RENALE

RIGETTO RENALE

Il rigetto da trapianto renale è l'espressione clinica (peggioramento funzionale) e/o istologica (quadro bioptico) di un insufficiente/mancato controllo della risposta immune; dal punto di vista patogenetico può riconoscere un meccanismo prevalentemente umorale (mediato da anticorpi diretti contro antigeni HLA e non-HLA del donatore) o cellulare (mediato dall'infiltrazione nel rene di linfociti T), ma in molti casi ambedue le componenti possono essere presenti.

Normalmente riferendosi al rigetto da trapianto renale si identificano tre forme principali, ognuna delle quali è caratterizzato da delle modificazioni distintive [9]:

1. Rigetto iperacuto/accelerato;
2. Rigetto acuto;
3. Rigetto cronico.

Rigetto iperacuto/accelerato: La prima forma di rigetto, dovuto alla presenza già al momento del declampaggio dei vasi durante l'intervento in sala operatoria (da minuti o massimo ore dal trapianto), di anticorpi diretti contro antigeni di istocompatibilità del donatore, è praticamente scomparso grazie al perfezionamento delle tecniche di *cross-match* (esame che, nelle ore immediatamente precedenti al trapianto, mettendo a contatto il siero del candidato con i linfociti del donatore, evidenzia in vitro la presenza di tali anticorpi). La seconda forma si verifica nell'arco di 3 giorni dal trapianto ed è dovuto alla presenza di anticorpi pre-esistenti (pazienti iperimmuni) a basso titolo oppure alla risposta anamnesticca, nei confronti di un precedente esposizione ad antigeni presenti nel donatore. Già durante l'operazione il chirurgo può notare che l'organo risulta di consistenza flaccida e di colore anomalo bluastrò. Entrambe le forme evolvono in un'estesa trombosi vascolare ed un'emorragia con infiltrazione di neutrofili, che affliggono preferibilmente

arterie, arteriole e glomeruli. Tale situazione è dovuta alla presenza di anticorpi preformati contro gli antigeni di istocompatibilità del donatore, prodotti durante precedenti gravidanze, trasfusioni di sangue o trapianti di rene. Questa condizione patologica è facilmente evitabile eseguendo un crossmatch pretrapianto, testando la loro formazione mettendo a contatto il siero del candidato con i linfociti del donatore, in vitro [17].

Rigetto cronico: E' un'entità meno facilmente definita sia nel suo profilo clinico che patogenetico in quanto non è sempre ben discriminabile dal danno derivante da meccanismi non immunologici, tanto che molti autori lo definiscono nell'ambito della cosiddetta nefropatia cronica da trapianto, a patogenesi multifattoriale e si può verificare sin dai primi mesi. Clinicamente si manifesta come un incremento progressivo della creatinemia con ipertensione e proteinuria lieve-moderata (1-2g/die), il tutto dovuto al lento declino della funzione renale, alla persistente infiltrazione interstiziale di cellule T e macrofagi, da un danno vascolare (fibrosi intimale e mediale) grave fino all'occlusione. Spesso anche i glomeruli risultano anomali dando origine ad una glomerulopatia cronica da trapianto. Questo tipo di rigetto sembra riconoscere una base patogenetica umorale (insorgenza di anticorpi specifici nei confronti del donatore e frequente positività del complemento CD4 (*Cluster of Differentiation 4*)) ed il trattamento è difficile e controverso, poiché frequentemente non si dimostra responsivo nei confronti delle moderne terapie.

Rigetto acuto: Il rigetto acuto "classico" è di tipo interstiziale cellulo-mediato, ma può riconoscere anche una componente umorale [9]. Nella maggioranza dei casi si manifesta entro 3-6 mesi dal trapianto, ma può essere anche più precoce. Una volta escluse tutte le altre cause che possono essere responsabili di deterioramento funzionale la diagnosi clinica si basa fondamentalmente sull'aumento della creatinina plasmatica. Gli episodi di rigetto acuto sono caratterizzati dalla presenza di segni clinici tra cui febbre, malessere, dolore nella regione localizzata dall'organo trapiantato, oliguria, proteinuria e un aumento della creatinina sierica (aumento percentuale del 30% rispetto alla baseline). Alcuni esami strumentali possono essere di supporto (scintigrafia, ecografia, eco-color-Doppler), ma in condizioni di oligo-anuria (dove la creatinina plasmatica perde di significato) o in presenza di farmaci nefrotossici la diagnosi clinica può essere solo di probabilità. È opportuno, quindi, prima di iniziare un trattamento anti-rigetto disporre di una diagnosi biotica seguendo i criteri standardizzati della classificazione BANFF [18].

La classificazione BANFF permette di suddividere i vari casi in 6 categorie diagnostiche:

1. Normale: biopsia istologicamente normale.

2. Rigetto anticorpo-mediato: causato dalla presenza di anticorpi anti-donatore e complemento dell'immunità innata. Suddiviso in:

- a. *Acute/active Antibody-Mediated Rejection (ABMR)*
- b. *Chronic active ABMR*
- c. C4d staining without morphologic evidence of acute rejection

3. Modificazioni borderline

4. Rigetto cellulo-mediato:

- a. *Acute T cell-Mediated rejection (TCMR)*
- b. *Chronic active TCMR*

5. Fibrosi interstiziale e atrofia tubulare, in assenza di specifica eziologia: E' normalmente detta nefropatia cronica da trapianto.

6. Altre modificazioni non causate da rigetto acuto e/o cronico. Include ipertensione cronica, tossicità da inibitori della calcineurina, ostruzione cronica, pielonefriti e infezioni virali..

Secondo i dati raccolti tra il 2005 e il 2009 [19], l'incidenza di un episodio di rigetto acuto entro cinque anni dal trapianto è stata del 17% per trapianti da donatore vivente e del 20% per quelli da cadavere.

Esistono due meccanismi immunopatologici responsabili del rigetto acuto: immunità cellulo-mediata (via linfociti T) e immunità anticorpo-mediata o umorale (via linfociti B).

Nella forma più comune, cellulo-mediata, si evidenziano a sua volta due tipologie di danno all'indagine bioptica:

- Tubulo-interstiziale: caratterizzato da edema diffuso associato ad un' infiltrazione di linfociti, e in forma minore monociti, a livello dell'interstizio. Quando si verifica l'invasione di tali cellule infiammatorie nelle pareti e nel lume dei tubuli, l'epitelio e la membrana basale tubulare vanno incontro a lesioni caratteristiche, dette tubuliti (infiammazioni tubulari). In questo caso le pareti dei tubuli risultano danneggiate e fessurate.
- Vascolare: Anche in questo caso intervengono linfociti e monociti, i quali si infiltrano nel sottoendotelio delle arteriole, con interessando la tonaca media e il rischio di trombosi nei casi più gravi. A livello dei capillari dei glomeruli può dare origine alla glomerulopatia acuta da trapianto. Le cellule endoteliali presentano un aspetto tipico: risultano ingrandite e vacuolate.

Nel rigetto acuto umorale si identificano altre due tipologie di danno:

- Vascolare: E' la forma meno comune ed è caratterizzata da arteriti necrotizzanti (infiammazione dei vasi sanguigni, che si estende dalla tonaca media all'avventizia, che crea lesioni che comportano la necrosi delle pareti del vaso), necrosi fibrinoide (necrosi dei tessuti connettivali con deposizione di materiale fibrinoide composto da gammaglobuline e sostanze proteiche di origine nucleare, da fibrinogeno e complemento) e infiammazione a livello della parte delle arterie, e della presenza di linfociti, monociti e neutrofilo. L'endotelio risulta fortemente danneggiato e soggetto a trombosi. Tali lesioni sono spesso la conseguenza di infarto della zona corticale del rene associato a emorragia interstiziale.
- CD4 positiva: E' la forma più diffusa ed è caratterizzata dal coinvolgimento degli anticorpi anti-HLA del donatore e dall'attività del sistema del complemento . L'attivazione della via classica della cascata del complemento comporta danno tissutale e fenomeni coagulativi [nota: Nel sistema della coagulazione, la cascata proteolitica porta all'attivazione della trombina, che quindi taglia il fibrinogeno solubile circolante per dar luogo al coagulo di fibrina. Inoltre il complemento recluta macrofagi, neutrofilo e produce la proteina C4d, risulta legata covalentemente all'endotelio dei capillari tubulari o alla membrana basale, fungendo da marcatore per segnalare l'attivazione complementare associata al rigetto umorale. L'unico modo per diagnosticare questa tipologia di rigetto umorale è attraverso indagine in immunostochimica. Rispetto al rigetto cellulo-mediato e alla forma vascolare di rigetto umorale prevede un diverso trattamento ed è caratterizzato da una diversa prognosi [8].

Trattandosi di un allotrapianto in ospite immunocompetente, il rene sarebbe inevitabilmente obiettivo di una risposta immunitaria, che tenderebbe a distruggerlo.

TERAPIE IMMUNOSOPPRESIVE

Negli ultimi 30 anni, sono stati introdotti nuovi agenti terapeutici per fronteggiare le più frequenti patologie renali (glomerulonefriti acute e croniche), per rallentare la progressione di CKD e per ridurre lo sviluppo di complicanze cliniche associate al trattamento sostitutivo (emodialisi e dialisi peritoneale) e al trapianto renale. Comunque, il diffuso utilizzo di questi trattamenti è stato accompagnato da una serie di problematiche correlate alla terapia (iperdosaggio, dosaggio subterapeutico, reazioni avverse) con un notevole impatto clinico e un costo enorme per il Servizio Sanitario Nazionale. Per fare un esempio, basta citare gli inibitori della calcineurina utilizzati per

prevenire il rigetto. Paradossalmente, il principale effetto avverso associato a questa classe di farmaci è la nefrotossicità. Inoltre, l'uso cronico può contribuire alla comparsa di insufficienza renale nei pazienti trapiantati. Essi inoltre possono causare l'aggravamento di varie condizioni, quali ipertensione e iperlipidemia, determinando un profilo cardiovascolare sfavorevole. Possono infine incrementare il rischio di diabete [20].

Esistono due strategie adottate per ridurre il processo difensivo che il sistema immunitario mette in atto:

1. Ricerca della **migliore isto-compatibilità** possibile tra donatore e ricevente. Gli antigeni HLA di classe I e II svolgono un ruolo cruciale nei processi di riconoscimento antigenico e di target della risposta immune.
2. Messa in atto, contestualmente al trapianto di una **terapia immunosoppressiva modulata**, così da inibire la risposta al rigetto senza compromettere l'efficienza protettiva del sistema immunitario del ricevente verso infezioni e neoplasie [9].

L'utilizzo ottimale dei farmaci immunosoppressori richiede una buona conoscenza delle loro caratteristiche farmacocinetiche, soprattutto per le molecole caratterizzate da un ristretto indice terapeutico. In questo caso piccole variazioni nel profilo cinetico possono determinare l'eccessiva esposizione al farmaco e quindi la comparsa di effetti collaterali anche gravi, oppure un livello di immunosoppressione inadeguato, con il rischio di rigetto acuto o cronico.

Per comprendere adeguatamente il meccanismo di azione dei farmaci immunosoppressivi è bene far riferimento al modello a 3 segnali della risposta immunitaria:

- **Segnale 1:** Si tratta di un segnale antigene specifico, ovvero i diversi antigeni vengono presentati dalle cellule *Antigen Presenting Cells* (APC) del donatore, attraverso il complesso maggiore di istocompatibilità MHC al T cell-receptor presente sulla superficie dei linfociti T del ricevente. Tale interazione produce, attraverso il CD3, l'attivazione di una via di trasduzione del segnale a livello linfocitario.
- **Segnale 2:** cosiddetto segnale di costimolazione, indotto dal contatto di molecole di adesione, localizzate sia sulla superficie delle cellule APC, che del linfocita T. Assieme questi due segnali comportano l'attivazione del linfocita T, a seguito di un incremento di ioni calcio citoplasmatico. Il calcio forma un complesso con la calmodulina che attiva una serie di enzimi, tra cui la Calcineurina, che a sua volta defosforila una famiglia di proteine *Nuclear Factor Activating T cells* (NF-AT), che penetrando nel nucleo stimolano la sintesi di IL-2 e altre citochine.

- **Segnale 3:** dato dal legame di IL-2 e il suo recettore linfocitario CD25, il quale dà luogo all'attivazione di una complessa cascata di chinasi e fattori di crescita. Tra questi il complesso mTOR, gioca un ruolo chiave nella modulazione di altre chinasi indispensabili per la proliferazione linfocitaria.

La risposta immune in definitiva consta di 3 fasi: riconoscimento degli antigeni *non-self*, attivazione dei linfociti antigene-specifici, e fase effettrice di rigetto dell'organo trapiantato.

La terapia immunosoppressiva, per prevenire e trattare il rigetto, si è evoluta nel corso degli ultimi 20 anni introducendo **nuovi farmaci**, aventi differenti meccanismi d'azione, per i quali sono stati individuati schemi terapeutici più confacenti alle caratteristiche individuali delle combinazioni donatore/ricevente al fine anche di **minimizzare gli effetti collaterali**.

Di seguito vengono riportate le categorie di farmaci che, attualmente, sono maggiormente in uso [8,9,21-23]:

- **Inibitori delle calcineurine (CNI):** appartengono a questa classe di farmaci la *ciclosporina* (CsA) e il *tacrolimus* (TAC). Rappresentano i farmaci cardine della terapia antirigetto e possiedono un meccanismo d'azione simile. CsA forma un complesso con la ciclofilina inibendo così l'attività fosfatase della calcineurina; impedisce così la traslocazione nel nucleo dei fattori nucleari delle cellule T attivate (NF-AT) e quindi la trascrizione dei geni codificanti per numerose citochine e mediatori di immunità, tra cui IL-2. TAC invece agisce sulla *FK-binding protein-12* (FKBP 12), reprimendo a valle la stessa via del segnale. L'inibizione della calcineurina indotta da queste molecole blocca l'attivazione dei linfociti T e quindi anche la risposta umorale da parte dei linfociti B.
- **Inibitori della sintesi del DNA:** Il capostipite di questa classe di farmaci è l'*azatioprina* (AZA) che, a seguito di due reazioni enzimatiche, viene convertito in 6-tioguanina nucleotide (6-TGN), che una volta incorporato nel DNA, svolge un'azione citotossica diretta e sopprime la sintesi de novo delle purine. Blocca la sintesi di DNA e RNA, inibendo la proliferazione linfocitaria. La potente azione inibitrice che questo farmaco induce a livello del midollo osseo può causare uno stato di leucopenia anche grave, quindi va somministrato alla dose adeguata. Spesso viene utilizzato in combinazione con gli CNI.
- **mTOR inibitori:** come già accennato precedentemente mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) è una chinasi che svolge un ruolo centrale nella regolazione del processo di divisione cellulare. Gli inibitori di mTOR, *sirolimus* (o rapamicina, un antibiotico

macrolide) ed *everolimus* (derivato del primo) rappresentano una classe di inibitori della proliferazione cellulare utilizzati nel trapianto renale, dotati di un ampio spettro di attività tra cui la soppressione dei linfociti T e la riduzione della crescita tumorale (inibiscono il *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF). Entrambi formano un complesso con la proteina FKBP, come il tacrolimus, che a sua volta si lega con alta affinità al mTOR inibendolo e causando un blocco efficace della proliferazione linfocitaria indotta dall' IL-2. Ciò causa l'arresto della progressione del ciclo cellulare nella fase G1-S.

- **Micofenolato mofetile:** Il micofenolato mofetile (MMF) è un profarmaco che viene rapidamente idrolizzato nel suo metabolita attivo, l'acido micofenolico (MPA), il quale agisce bloccando la sintesi nucleotidica mediante l'inibizione reversibile e selettiva dell'enzima inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH), che svolge un ruolo chiave nella sintesi de novo delle purine. La deplezione di questi nucleotidi determina un effetto antiproliferativo sui linfociti sia T che B, compromettendo anche la produzione di immunoglobuline. Tale azione risulta altamente selettiva poiché gli altri tipi cellulari sono in grado di utilizzare la via di "salvataggio" per la sintesi delle purine, che non viene perciò inibita dal farmaco. Inoltre MPA induce una ridotta espressione di molecole di adesione sulla superficie dei linfociti, impedendo il loro attacco all'endotelio vascolare, e inibisce il reclutamento delle cellule mononucleate nei siti di rigetto.
- **Corticosteroidi:** I target cellulari della terapia steroidea sono molteplici. Il meccanismo d'azione sul sistema immunitario si esplica attraverso la ridotta attivazione dei linfociti T *helper* e *suppressor*, l'interferenza sulle funzioni dei macrofagi, l'inibizione dell'espressione degli antigeni di classe I e II del sistema HLA, la ridotta produzione di citochine (tra cui IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF- α , e INF- γ), e se usati ad alte dosi, anche l'inibizione della risposta citotossica. Pertanto i corticosteroidi, a differenza della CsA, sono utilizzati sia per la profilassi, che per il trattamento del rigetto acuto. In considerazione dei numerosi effetti collaterali della terapia corticosteroidica a lungo termine, negli ultimi 20 anni, in molti centri si è cercato di apportare dosaggi sempre più bassi o di sospenderla il più possibile.
- **Anticorpi mono- e poli-clonali:** Gli anticorpi diretti contro epitopi di membrana dei linfociti attivati rivestono un ruolo centrale nella terapia di induzione e trattamento antirigetto acuto resistente alla terapia steroidea. Tra questi agenti troviamo: anticorpi anti CD3, che riconoscono il T cell receptor; anticorpi policlonali antitimociti che riconoscono

più antigeni di superficie; anticorpi monoclonali umanizzati anti CD25, rivolti contro la subunità α del recettore per IL-2, la cui espressione è aumentata sui linfociti T attivati.

GENI CONNESSI CON IL RIGETTO ACUTO

L'enorme variabilità nella risposta al trattamento farmacologico dipende da numerosi fattori in grado di alterare la biodisponibilità del farmaco e la sua cinetica: fattori fisiologici o patologici del singolo e fattori ambientali. Negli ultimi anni si è potuto constatare che la variabilità interindividuale nella risposta ai farmaci sia dovuta a varianti polimorfiche presenti in geni che codificano specifiche proteine, quali recettori, trasportatori e trasduttori cellulari [24], che risultano essere target degli stessi farmaci [25].

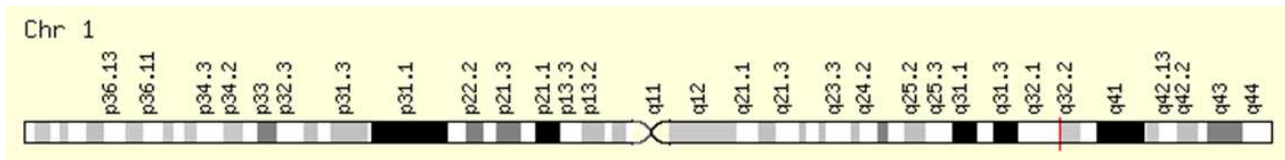
L'esito del trapianto renale sottolinea come vi sia una sostanziale variabilità interindividuale nei pazienti trattati con lo stesso regime immunosoppressivo. E' stato dimostrato che le differenze genetiche possono incidere in termini di sopravvivenza del trapianto renale [24] e sopravvivenza del paziente [26].

Evidenze scientifiche riportano che alcuni polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) localizzati in geni coinvolti nella risposta immunitaria e nella farmacocinetica/farmacodinamica dei farmaci immunosoppressivi sono associati con il rigetto da allotrapianto nei pazienti trapiantati di rene [27,28]. Inoltre, il ruolo delle citochine e di altri mediatori immunitari coinvolti nello sviluppo di rigetto ha comportato uno studio sempre più mirato dei polimorfismi e dei profili di espressione genica di diversi geni [29-31].

Facendo riferimento alla letteratura tra i numerosi geni correlati alla risposta immunitaria e all'evento di rigetto acuto da trapianto renale, si evidenziano alcuni geni cruciali nei riceventi: due target della risposta infiammatoria e tre target della terapia immunosoppressiva. Le citochine che regolano la risposta immune sono coinvolte nella patogenesi di numerose patologie, inclusa il rigetto da allotrapianto [32]. E' stato riportato che il tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) e l'interleuchina 10 (IL-10) giocano un ruolo nella patogenesi del danno da ripercussione renale e insufficienza d'organo, e sono rilasciate durante l'evento di rigetto [33]. ABCB1 è associato alla farmacocinetica del Tacrolimus, UGT1A9 influenza la biodisponibilità dell'acido micofenolico e IMPDH2 è target del farmaco stesso.

INTERLEUCHINA-10 (IL-10)

Il gene dell'interleuchina-10 (IL-10) è localizzato nel cromosoma 1q32.1 ed è composto da 5 esoni.

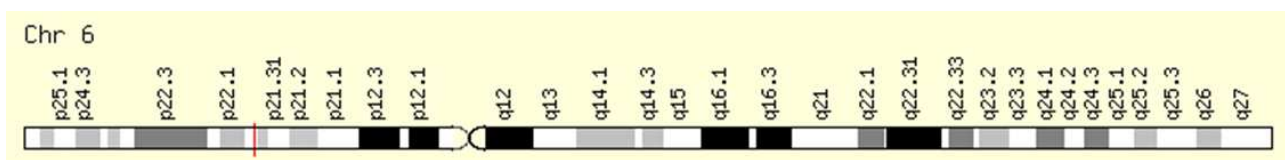


La proteina codificata da questo gene è prodotta principalmente da monociti e in misura minore dai linfociti. E' composta da 178 aminoacidi per un totale di 20517 Da. Questa citochina è causa di effetti pleiotrofici sull'immunoregolazione e sull'infiammazione (antinfiammatoria), inibendo la sintesi di numerose citochine, incluse IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF e GM-CSF, prodotte dai macrofagi attivati e dai linfociti T *helper* (Th), e riducendo l'espressione delle citochine Th1, degli antigeni MHC di classe II, e delle molecole costimolatorie

presenti sui macrofagi. Favorisce la sopravvivenza delle cellule B, la proliferazione, e la produzione anticorpale. Può bloccare l'attività del complesso NF-KB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, complesso proteico funzionante come fattore di trascrizione), ed è coinvolto nella regolazione della via di segnalazione delle JAK/STAT. L'IL-10 è uno dei principali inibitori delle risposte dell'ospite, soprattutto di quelle mediate dai macrofagi e per questo motivo essa può essere considerata un classico esempio di regolazione a feedback negativo. Eventuali mutazioni in questo gene sono associate ad una maggiore suscettibilità all'HIV-1 e all'artrite reumatoide [34].

TUMOR NECROSIS FACTOR-ALFA (TNF- α)

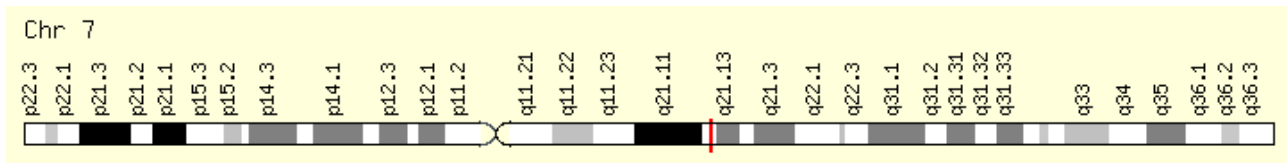
Il gene del TNF- α si trova nel cromosoma 6p21.3 ed è composto da 4 esoni.



Questo gene codifica per una proteina composta da 233 aminoacidi, 25644 Da. E' una citochina multifunzionale proinfiammatoria che appartiene alla famiglia tumor necrosis factor (TNF) secreta dai macrofagi, e in alcune circostanze può avere un'azione antineoplastica [31]. Agisce ed esplica le sue funzioni attraverso il legame con i recettori TNFRSF1A/TNFR1 e TNFRSF1B/TNFR2. TNF- α è un potente pirogeno che agisce sia direttamente, che attraverso la stimolazione della secrezione di IL-1, inducendo uno stato di cachessia. Questa citochina è coinvolta nella regolazione di molteplici processi biologici come proliferazione cellulare, differenziazione, apoptosi, metabolismo lipidico, e coagulazione. E' associata inoltre a varie patologie, tra cui malattie autoimmuni, insulino resistenza, e cancro [34].

ATP Binding Cassette subfamily B member 1 (ABCB1)/ MultiDrug Resistance 1 (MDR1)

Il gene ABCB1/MDR1 è presente nel cromosoma 7p21.12 ed è composto da 29 esoni.



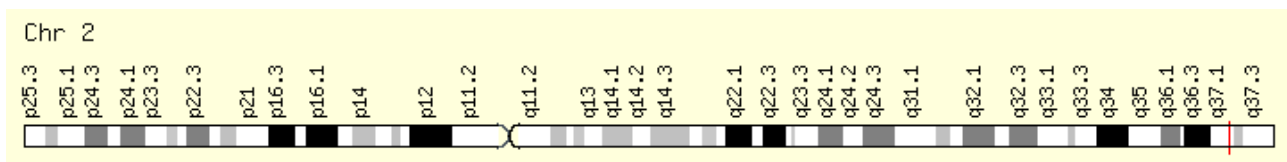
La proteina codificata dal gene ABCB1 fa parte della superfamiglia dei trasportatori di membrana ATP-binding cassette, ed è costituita da 1280 aminoacidi e pesa 141479 Da.

In generale, le proteine ABC (*ATP binding cassette*) sono suddivise in 7 sottofamiglie (ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, White) e hanno tutte la stessa funzione: trasportare molecole di varie dimensioni attraverso la membrana cellulare. L'ABCB1 fa parte della sottofamiglia MDR/TAP, la cui classe di molecole sono coinvolte nella multidrug resistance. Questa p-glicoproteina è una pompa di efflusso ATP-dipendente per composti xenobiotici ad elevata specificità, in grado di determinare il passaggio di numerosi farmaci, dal dominio intra a quello extracellulare, causandone un'alterazione della farmacocinetica e un'aumentata tossicità [35]. Il gene MDR1 viene espresso da numerosi leucociti, compresi linfociti T e B [36], ecco perché alcuni studi riportano il ruolo dei principali SNP di ABCB1 [37] coinvolti nella farmacocinetica degli inibitori della calcineurina come il Tacrolimus e Ciclosporina, nei pazienti trapiantati di rene [38,39].

Questo gene viene inoltre correlato alla resistenza ai farmaci antitumorali. Altra funzione di questa proteina è il trasporto di sostanze attraverso la barriera ematoencefalica.

UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9 (UGT1A9)

Il gene UGT1A9 si localizza nel cromosoma 2q37.1 e consta di 5 esoni.

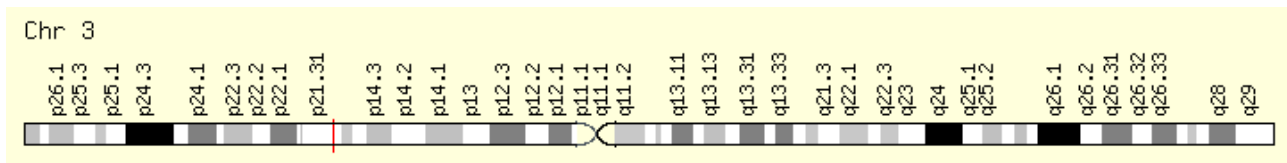


Questo gene codifica per una UDP-glucuronosiltransferasi 1A9, un enzima della via della glucuronazione che trasforma piccole molecole lipidiche, come steroidi, bilirubina, ormoni, e farmaci, in metaboliti idrofili facilmente eliminabili. E' fortemente espresso nel fegato, ma anche nel tratto gastrointestinale e a livello renale. E' in grado di metabolizzare l'MPA nella sua forma inattiva glucuronata, la quale viene riconvertita nel tratto gastrointestinale ad MPA dove viene riassorbito [40]. Diversi studi indicano che alcuni polimorfismi presenti in questo gene favoriscono

la glucuronidazione (esterificazione dei gruppi ossidrilici di una molecola con acido glucuronico, con lo scopo di renderla idrofila e facilmente eliminabile) dell'acido micofenolico, con una conseguente riduzione dei livelli del farmaco nei soggetti post-trapiantati [34,41,42].

IMP (inosina 5'-monofosfato) deidrogenasi 2 (IMPDH2)

Il gene IMPDH2 si trova nel cromosoma 3p21 e comprende 15 esoni.



La proteina codificata da questo gene si compone di 514 aminoacidi, con un peso di 55805 Da. L'inositolo monofosfato deidrogenasi è l'enzima chiave nella sintesi de novo del nucleotide guanosina, catalizzando l'ossidazione NAD-dipendente dell'inosina-5'-monofosfato a xantina-5'-monofosfato, convertita successivamente in guanosina-5'-monofosfato. Questo enzima è quindi coinvolto nel mantenimento della riserva cellulare di guanosina deossi- e ribonucleotide necessario per la sintesi di DNA e RNA ed interviene nella proliferazione cellulare (per es. dei linfociti). L'inibizione dell' IMPDH2 ad opera dell'acido micofenolico costituisce parte della terapia immunosoppressiva alla quale sono sottoposti i pazienti con trapianto di rene [43]. Le varianti polimorfiche di questo gene sono associate ad un incremento dell'azione dell'IMPDH2 e alla riduzione dell'attività antiproliferativa dell'acido micofenolico sui linfociti [32].

Questo gene è sovraespresso in alcune forme di neoplasie; per questo motivo si ritiene possa giocare un ruolo nella proliferazione maligna [34].

POLIMORFISMI GENETICI

Il profilo genetico di un individuo determina sia le caratteristiche dei bersagli dei farmaci sia delle proteine coinvolte nel processo del loro assorbimento e metabolismo.

Il genoma umano rappresenta il set completo del DNA di un organismo, composto approssimativamente di 3,2 miliardi di paia di basi di DNA, e comprende all'incirca 20.000–25.000 geni [44]. Il genoma umano contiene variazioni nella sequenza di basi tra un individuo e l'altro, in media ogni poche centinaia di basi. Alcune varianti della sequenza si manifestano in aree che non codificanti e, pertanto, non hanno alcun effetto diretto sulla qualità delle proteine. Altre intervengono sulle caratteristiche fisiche alterando i prodotti dell'RNA e delle proteine. Le varianti

geniche sono responsabili di alcune differenze fisiche tra gli individui altre sono responsabili di patologie specifiche [45].

Il gene all'interno del cromosoma occupa una particolare regione del genoma definita locus (plurale loci). Nell'essere umano sono presenti due copie di tutti i cromosomi. Lo stesso vale per la maggior parte dei geni, che sono quindi ereditati in copie e possono essere sotto forma dello stesso allele, caso in cui l'individuo è omozigote, o di due alleli diversi, caso in cui l'individuo è eterozigote [46]. Per allele si intende la variante dello stesso gene. Mentre con il termine genotipo ci si riferisce alla composizione genica di ciascun individuo, con fenotipo ci si riferisce ad una caratteristica osservabile di un organismo [47].

Ogni individuo differisce da un altro per la presenza di numerose varianti nei loci genici, le quali vengono comunemente denominate varianti polimorfiche [45].

Un polimorfismo è formalmente definito come la presenza di almeno due alleli in un *locus* [45] in cui l'allele più raro risulta avere una frequenza pari o maggiore dell'1% rispetto al resto della popolazione [48].

Esistono quattro tipi principali di polimorfismi:

- **Polimorfismo a singolo nucleotide (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*):** Rappresenta la forma più comune, caratterizzato dalla variazione della sequenza di DNA a carico di un solo nucleotide. La differenza sta nella sostituzione di una base azotata con un'altra. Nell'essere umano gli SNP rappresentano il 90% di tutta la variabilità che si verifica nelle sequenze di DNA di individui diversi. L'alta frequenza degli SNP indica che questo tipo di polimorfismo è la norma per la maggioranza dei geni umani [47]. Gli SNP possono localizzarsi in una qualsiasi parte del genoma, inclusi gli esoni, così come nelle regioni comprese tra geni diversi. Sono generalmente evidenziati attraverso tecniche di sequenziamento [45].
- **Ripetizioni di sequenze semplici:** Si tratta di segmenti di DNA nei quali sequenze di-, tri- o tetranucleotidiche sono ripetute diverse volte. Il numero preciso di ripetizioni varia da individuo ad individuo e può essere misurato attraverso amplificazione con PCR, seguito dalla corsa in elettroforesi su gel di poliacrilamide [45].
- **Polimorfismi di lunghezza:** coinvolgono brevi sequenze in tandem che si suddividono in base alla loro lunghezza in : VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) sono delle sequenze nucleotidiche della lunghezza di 9-100 bp, mentre gli STR (*Short Tandem Repeat*) sono sequenze di 1-6 bp. Tali segmenti variano frequentemente da un cromosoma omologo all'altro per composizione in basi dei monomeri e sono ripetuti in un determinato locus un

numero di volte variabile e diverso da individuo ad individuo. Ciò consente il riconoscimento e la discriminazione del DNA appartenente ad individui differenti in base alle lunghezze delle regioni considerate. In particolare gli STR essendo distribuiti in tutto il genoma e altamente informativi vengono utilizzati per scopi identificativi.

- **Variazione del numero di copie (*Copy Number Variation, CNV*):** consiste in segmenti di DNA, della grandezza da una kb fino a 1Mb, che presentano una variazione del numero di copie rispetto ad una genoma di riferimento. Una CNV può essere a struttura semplice, come per esempio una duplicazione in tandem, oppure coinvolgere perdite o acquisti di intere sequenze in molteplici siti del genoma [49].

Il termine polimorfismo non implica che una determinata variante del DNA possa avere un effetto fenotipico; infatti molti polimorfismi sono silenti poiché si trovano in regioni che non codificano per RNA e proteine. Alcuni, invece, cadendo all'interno o nei pressi di sequenze codificanti o regolatrici, possono essere non significativi dal punto di vista clinico o, in alcuni casi, i fenotipi possono contribuire allo sviluppo di una malattia [45] o determinare l'espressione di un particolare carattere.

Uno SNP può portare alla formazione di una proteina diversa nella struttura, nella funzione o nella quantità e pertanto ad una modifica della capacità dell'organismo umano di utilizzare e metabolizzare i farmaci. Soggetti con un particolare genotipo possono non essere in grado di metabolizzare particolari farmaci e quindi presentare un maggior rischio di reazioni avverse oppure di interazioni con altri farmaci. Altri geni sono in grado di determinare una rapida metabolizzazione di alcuni farmaci, con conseguente loro parziale inefficacia. Il meccanismo d'azione della maggior parte dei farmaci dipende dall'interazione del farmaco con specifiche proteine bersaglio quali recettori, trasportatori e vie di trasmissione cellulare. Molti di questi bersagli farmacologici presentano polimorfismi che possono influenzare la risposta a specifici farmaci.

Gli SNP, per la loro diffusione all'interno del genoma, sono spesso utilizzati negli studi di associazione caso-controllo. Questa tipologia di studi appartiene alla categoria degli studi osservazionali. Gli studi caso-controllo sono impiegati per valutare il ruolo di uno o più fattori di rischio nell'eziopatogenesi di una malattia o di una particolare condizione clinica, nella stima del rischio relativo e nella valutazione del ruolo di singoli fattori di rischio e della loro eventuale interazione. L'impostazione dello studio considera due gruppi di soggetti: i malati (o le persone affette da una particolare condizione) che costituiscono i casi ed i controlli ovvero i soggetti che condividono il maggior numero di caratteristiche con i primi, ma dai quali differiscono solo per il

fatto di non presentare quella condizione. Attraverso un confronto statistico l'evidenza di varianti negli SNP possono essere associate alla presenza o assenza del disturbo [50].

Nella genetica di popolazioni, sono fondamentali due misure: le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche. Le frequenze alleliche e genotipiche sono sempre uguali o inferiori a 1 (oppure uguali o inferiori al 100%). Se un gene è monomorfo la frequenza dell'unico allele sarà uguale oppure vicina a 1,0. Nel 1908 un matematico britannico, Godfrey Harold Hardy, e un medico tedesco, Wilhem Weinberg, derivarono in modo indipendente una semplice equazione che prevedeva la stabilità delle frequenze alleliche e genotipiche da una generazione a quella successiva: equilibrio di Hardy-Weinberg [46].

Se un gene è polimorfo ed esiste in due forme alleliche A e a:

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

p^2 equivale alla frequenza genotipica di AA (omozigoti)

$2pq$ equivale alla frequenza genotipica di Aa (eterozigoti)

q^2 equivale alla frequenza genotipica di aa (omozigoti)

L'equazione di Hardy-Weinberg prevede l'equilibrio (stabilità delle frequenze alleliche e genotipiche di generazione in generazione) se in una popolazione si verificano determinate condizioni:

- Assenza di nuove mutazioni (il gene d'interesse non subisce alcuna nuova mutazione)
- Assenza di deriva genetica (la popolazione è così grande che le frequenze alleliche non variano a causa degli effetti del campionamento casuale ad es. mediante effetto del fondatore e collo di bottiglia)
- Assenza di migrazione (gli individui non si spostano in popolazioni diverse)
- Assenza di selezione naturale (tutti i genotipi hanno lo stesso successo riproduttivo)

Incrocio casuale (rispetto al gene d'interesse, i membri di quella popolazione si accoppiano a prescindere dai loro fenotipi, genotipi).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo scopo principale dello studio è quello di determinare i profili degli SNP associati all'evento di rigetto acuto in pazienti trapiantati di rene.

In particolare:

- Determinare le frequenze alleliche e genotipiche degli SNP nei geni correlati al rigetto acuto nei gruppi analizzati;
- Determinare le possibili associazioni genetiche tra le varianti polimorfiche (SNP) e l'evento rigetto acuto nei pazienti trapiantati di rene.

L'obiettivo finale dello studio è quello di identificare un particolare allele associato all'evento rigetto acuto così da poter fornire al clinico le informazioni necessarie per *caratterizzare* il paziente da un punto di vista genetico, identificando i soggetti a minor (o maggior) rischio di rigetto acuto renale.

MATERIALI E METODI

1. Tipo di studio e arruolamento

È stato condotto uno studio osservazionale caso-controllo, non appaiato con indipendenza tra le popolazioni studiate; il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico di Vicenza (numero 32/11).

Sono stati arruolati pazienti caucasici che afferiscono al centro trapianti del Dipartimento di Nefrologia Dialisi e Trapianto Renale dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza e che hanno sottoscritto il consenso informato come indicato dall'accordo di Helsinki.

La popolazione studiata appartiene a tre gruppi:

1. Gruppo Casi: pazienti sottoposti a trapianto di rene con almeno un evento di rigetto acuto;
2. Gruppo Controllo I: pazienti sottoposti a trapianto di rene senza alcun episodio di rigetto acuto;
3. Gruppo Controllo II: individui sani, donatori volontari di sangue.

Per l'arruolamento i criteri di inclusione adottati sono stati i seguenti:

Gruppo Casi:

- Età \geq 18 anni;
- Sottoscrizione del Consenso informato;
- Trapianto renale con almeno un evento di rigetto acuto.

Gruppo Controllo I:

- Età \geq 18 anni;
- Sottoscrizione del Consenso informato;
- Trapianto renale senza episodi di rigetto acuto.

Gruppo Controllo II:

- Età \geq 18 anni;
- Donatori di sangue sani privi di malattie conclamate.

2. Raccolta dei campioni e delle informazioni relative ai pazienti

Per ogni paziente appartenente al gruppo casi e al gruppo controlli I sono state raccolte 2 provette (9 ml) di sangue periferico in EDTA durante una visita ambulatoriale di follow-up, con sottoscrizione del consenso informato. I dati anagrafici e clinici, ovvero età, sesso, dati relativi al trapianto e al rigetto, terapie assunte e complicazioni, sono stati raccolti ed inseriti in un database.

Per il gruppo Controllo II è stata prelevata una provetta di sangue periferico in EDTA in forma anonima.

3. Selezione dei polimorfismi nei geni target

In questo progetto sono stati studiati 19 SNP in 5 geni.

- **rs1800872** nel gene IL-10.
- **rs1800629** nel gene TNF- α .
- **rs1045642**, **rs1128503** e **rs2032582** nel gene ABCB-1/MDR-1.
- **rs6714486**, **rs2741045**, **rs2741046** e **rs17868320** nel gene UGT1A9.
- **rs1155754**, **rs11557547**, **rs11557541**, **rs11557545**, **rs11557542**, **rs11557544**, **rs11706052**, **rs11557546**, **rs11557540**, e **rs1049818** nel gene IMPDH2.

4. Analisi genetica

Il protocollo previsto per l'analisi degli SNPs comprende le seguenti fasi:

- a. Estrazione del DNA
- b. Scelta dei primers
- c. Amplificazione (Polymerase Chain Reaction, PCR)
- d. Elettroforesi su gel di agarosio
- e. Purificazione dei prodotti di PCR
- f. Reazione di sequenza
- g. Purificazione della reazione di sequenza
- h. Corsa e lettura
- i. Analisi statistica

4.1 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA da sangue venoso periferico è stato utilizzato l'estrattore automatico NorDiag Arrow mediante il Blood DNA 200 Extraction Kit. Quest'ultimo sfrutta il principio di estrazione dell'acido nucleico mediante la presenza di biglie magnetiche in soluzione che si legano in modo selettivo alla superficie di DNA, e non alle altre componenti organiche presenti in soluzione. Il protocollo di estrazione prevede l'ottenimento di 100 µl di eluato di DNA a partire da un'aliquota di 200 µl di sangue intero.

Allo scopo di valutare la purezza e la concentrazione del prodotto ottenuto, 2 µl di ogni DNA estratto sono stati letti in uno spettrofotometro (Picodrop); esso, sfruttando la caratteristica assorbanza (260 nm) del DNA, ne calcola la concentrazione e la purezza cioè la possibile presenza di contaminazione da proteine (rapporto $260/280 \approx 1,8-1,9$) e da fenoli (rapporto $260/230 \approx 2-2,2$).

Al termine della quantificazione i campioni di DNA sono stati conservati ad una temperatura di -80°C.

4.2 Scelta dei primer

Ogni campione è stato analizzato per ciascuno dei 19 SNPs identificati.

Non essendoci kit in commercio in grado di riconoscere tali regione polimorfiche, ricavate dalla letteratura, le varie coppie di primers sono state disegnate utilizzando il programma Primer3 (Whitehead Institute) disponibile online.

Di seguito vengono riportate le caratteristiche delle coppie dei primer disegnate per gli SNPs studiati. Per alcuni polimorfismi sono state utilizzate le stesse coppie di primer, poiché risiedono nella stessa regione genomica compresa tra il primer forward e reverse, di conseguenza sono stati amplificati nella stessa sessione di PCR.

IL-10

SNPs	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Size (bp)
rs1800872	GCGTGTTCCCTAGGTCACAGT	ACTCTTACCCACTTCCCCCA	369

TNF- α

SNPs	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Size (bp)
rs1800629	GCCAAGACTGAAACCAGCAT	TTGGGGACACACAAGCATCA	515

ABCB1/MDR1

SNPs	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Size (bp)
rs1045642	AGTGTGGCCAGATGCTTGTA	CTGCCTACCACATGCATACAT	593
rs1128503	CAACATCAGAAAGATGTGCAA	TGAGTTGGCCATCTATCCACC	615
rs2032582	GTCCAAGAAGCTGGCTTTGCT	GCATGAGTTGTGAAGATAATA	446

UGT1A9

SNPs	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Size (bp)
rs2741045 rs2741046 rs6714486	CACAGGCGAGCCCAATTTA	GGTGGGAGAAATACCAGCACA	452
rs17868320	ACAGAGTCGTGCTGTTTTGC	AGGTCAAGGTGGGCGTATC	237

IMPDH2

SNPs	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Size (bp)
rs11557543 rs11557547 rs11557541	TGCTTGTTAGCATGCAGGTC	ATGATCGTTGCCCTTCTGAC	413
rs11557545 rs11557542	GATAAGCAGAGACCCCATGC	CACCCACCTCTTCCAAGAAA	300
rs11557544 rs11706052	ACAGGAAAGTTGCCATTGT	TCCTAGGACAAGAAGTAAGTCTCAG	283
rs11557546	GATTGTGCCCTGAAGGATGT	GTCTCTGTGGGCCCTATCAA	219
rs11557540	AGTACCCGTGAAGGCCAGT	GCAAGGTCACAGCAGAGATG	290
rs1049818	TGACCTCTGCCCTTCTTCAG	GGAACCTTTTGGACCTGGAAC	433

4.3 Amplificazione (PCR)

Ogni regione genomica di interesse è stata amplificata mediante reazione a catena della PCR in cappa sterile. 2 µl ogni DNA (30 ng/ µl) sono stati introdotti in un volume finale di 50 µl di una soluzione così composta: 25 µl di AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems), 18 µl di acqua, 2.5 µl di Primer Forward (10 pmoli/ml) e 2.5 µl di Primer Reverse (10 pmoli/ml).

La temperatura di annealing varia a seconda della coppia di primer forward e reverse utilizzata ed è stata valutata e stabilita mediante prove in gradiente di temperature differenti.

Successivamente ad un ciclo iniziale di denaturazione di 10 minuti a 95°C, sono stati eseguiti 35 cicli così disposti:

- denaturazione: 30 sec a 95°C;
- appaiamento: IL-10 -rs1800872- 30 sec at 54°C
TNF-α -rs1800629- 30 sec at 56°C
ABCB1/MDR1 SNPs -rs1045642, rs1128503, rs2032582- 30 sec at 54°C;
UGT1A9 SNPs -rs6714486, rs2741045, rs2741046- 30 sec at 54°C;
UGT1A9 SNP -rs17868320- 30 sec at 58°C;
IMPDH2 SNPs -rs1155754, rs11557547, rs11557541, rs11557545,
rs11557542, rs11557544, rs11706052, rs11557546- 30 sec at 58°C;

IMPDH2 SNP -rs11557540- 30 sec at 60°C;

IMPDH2 SNPs -rs1049818- 30 sec at 66°C;

- allungamento: 40 sec a 72°C.

Al termine dei 35 cicli è stato eseguito un ciclo finale di allungamento di 10 minuti a 72°C.

4.4 Elettroforesi su gel di agarosio

I campioni amplificati sono stati controllati mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio (Seakem GTG, Lonza) al 2%. 9 µl di reazione di PCR sono stati caricati insieme a 2 µl di Midori Green Direct (Nippon Genetics) che funge sia da intercalante del DNA che da loading buffer; oltre ai campioni è stato caricato anche un marcatore di peso molecolare 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) che durante la corsa elettroforetica si divide in 19 bande comprendendo un range da 100-12000 bp. La corsa è stata eseguita a 100 Volt costanti per 30 minuti circa. In questo modo ponendo il gel nel transilluminatore è stato possibile verificare l'altezza corretta della banda relativa all'amplicone in esame, la specificità della reazione e l'assenza di eventuali contaminazioni.

4.5 Purificazione dei prodotti di PCR

La purificazione degli amplificati è stata eseguita con ExoSAP-IT (Affymetrix, Inc.), una miscela di due enzimi idrolitici Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphate, che permette l'eliminazione di primers e dNTPs in eccesso dai prodotti di PCR. Il protocollo consiste nel diluire 2 µl della mixture il 10 µl di PCR (lavorando in ghiaccio). Successivamente incubare nel termociclatore per 15 min a 37°C e per altri 15 min a 80°C.

4.6 Reazione di sequenza

La reazione di PCR per sequenziamento diretto secondo Sanger è stata eseguita con BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) mediante il seguente protocollo e in un volume finale di 10 µl:

- 1 µl di primer (Forward o Reverse) concentrato 3,3 pmoli/µl;
- 2 µl di Buffer 10X (incluso nel kit);

- 2 μ l di BigDye Terminator Cycle Sequencing (incluso nel kit);
- 2 μ l di PCR purificata;
- 3 μ l di acqua sterile.

La reazione di sequenza è avvenuta in un termociclatore, il quale ha eseguito 25 volte il ciclo:

1. Denaturazione: 10 min a 96°C;
2. Appaiamento: 5 min a 50°C;
3. Allungamento: 4 min a 60°C.

Per ogni campione sono state preparate due reazioni di sequenza, in entrambi i sensi di lettura dei primers.

4.7 Purificazione della reazione di sequenza

La reazione di sequenza è stata purificata utilizzando le colonne Centri-Sep (Applied Biosystems); esse contengono un gel che, una volta idratato, permette di eluire rapidamente le grandi molecole, quindi il DNA, e di trattenere tutte le piccole molecole, quindi tutti gli altri componenti della reazione (come i Dye Terminators in eccesso).

4.8 Corsa e lettura

Le reazioni di sequenza purificate sono state analizzate mediante sequenziatore automatico. Un'aliquota di 3 μ l di eluato è stata mescolata a 12 μ l di formamide deionizzata HI-Di (Applied Biosystems). La miscela ottenuta è stata denaturata per 5 minuti a 95°C e quindi caricata nel sequenziatore AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Questo strumento esegue una elettroforesi capillare del DNA ed è in grado di rilevare la fluorescenza emessa a seguito dell'eccitazione con laser di ogni ddNTP che passa. In questo modo lo strumento acquisisce i segnali emessi e li traduce in picchi colorati (elettroferogramma), in cui ad ogni colore corrisponde un nucleotide.

Dopo il sequenziamento gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati con il programma Chromas versione 2.33 e controllate con la sequenza wild-type annotata in GeneBank usando BLAST.

5. Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come mediana e Range Interquartile (*InterQuartie Range*, IQR) o media \pm deviazione standard (Standard Deviation, DS), secondo la loro distribuzione. Le variabili categoriche sono state descritte come frequenze. Le variabili continue sono state confrontate con il test ANOVA o Kruskal Wallis a seconda della loro distribuzione tra i tre gruppi.

La numerosità campionaria è stata calcolata con il programma QUANTO versione 1.2.3 ipotizzando: valori di frequenza allelica presenti in letteratura con il rischio di rigetto acuto pari al 10%, e per individuare Odds Ratio (OR) di almeno 2, con $\alpha = 5\%$ bilaterale e potenza 80%. La numerosità campionaria determinata indicava un numero di soggetti pari a 69 per gruppo.

Per ogni SNP è stata determinata l'eterozigosità (HET) ed è stato eseguito il test per l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) nei gruppi controlli e nei casi, mediante il test del Chi-Square Goodness-of-Fit Test. La misura dell'eterozigosità (HET) indica quanti individui risultano eterozigoti per un determinato locus e rappresenta un indice di variabilità genetica.

Per ogni SNP sono state determinate le frequenze alleliche e le frequenze genotipiche. Le associazioni genetiche sono state esplorate mediante i test '*per-genotype*' analysis, '*per-allele*' analysis e '*linear trend*' analysis utilizzando il programma SAS version 9.1.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

La significatività statistica è stata valutata con il T-test a 2 code con un valore di $p < 0,05$.

RISULTATI

Caratteristiche della popolazione

Nello studio sono stati inclusi in totale 220 individui con un'età media di 53.1 anni: 70 donatori sani, 109 pazienti trapiantati senza alcun evento di rigetto acuto e 41 pazienti trapiantati con evento di rigetto acuto. Le caratteristiche cliniche della popolazione arruolata sono riportate nella Tabella 1. Il gruppo Controllo II ha un'età mediana di 49 anni (41-54 anni), 16 femmine (23%) e 54 maschi (77%); il gruppo Controllo I ha un'età mediana di 55 anni (48-62 anni), 42 femmine (38%) e 67 maschi (62%); infine, il gruppo Casi ha un'età mediana di 50 anni (42-62 anni), 5 femmine (12%) e 36 maschi (88%).

Confrontando la variabile età tra i tre gruppi ne risulta una differenza statisticamente significativa irrilevante dal punto di vista biologico (50 (42-62) anni vs 55 (48-62) anni vs 49 (41-54)anni; $p < 0.05$). Vi è invece una differenza statisticamente significativa tra i gruppi per quanto riguarda la variabile sesso ($p < 0.01$).

Characteristics	Case (41)	Control I (109)	Control II (70)	p-value
Gender:				0.003
Male	36 (88%)	67 (62%)	54 (77%)	
Female	5 (12%)	42 (38%)	16 (23%)	
Median age (p25 th -p25 th)	50 (42-62)	55 (48-62)	49 (41-54)	0.012

Tabella 1. Variabili sesso ed età nei tre gruppi studiati.

Genotipizzazione

Per ogni SNP è stata calcolata l'eterozigosità (HET) e l'equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) nei 3 gruppi studiati (Tabella 2,3,4). I polimorfismi del gene IMPDH2 (eccetto rs11706052) hanno un valore di HET pari a zero in tutti e 3 i gruppi, poiché possiedono un unico allele in quel locus.

Tutti i polimorfismi analizzati nel gruppo controllo I (Tabella 2) e II (Tabella 3) sono in equilibrio di Hardy-Weinberg ($p > 0.05$). Nel gruppo casi tutti gli SNPs risultano essere in equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) ($p > 0.05$) ad eccezione dello SNP rs1045642 appartenente al gene ABCB1/MDR1 il cui $p < 0.05$ (Tabella 4 in grassetto).

GENE	SNP	CHROMOSOME	HET observed	HWE p value
IL-10	rs1800872	Chr1	0.32	p= 0.15
TNF α	rs1800629	Chr6	0.22	p= 0.61
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	0.48	p= 1.00
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	0.50	p= 0.45
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	0.52	p= 0.51
UGT1A9	rs2741045	Chr2	0.36	p= 0.20
UGT1A9	rs2741046	Chr2	0.36	p= 0.20
UGT1A9	rs6714486	Chr2	0.05	p= 0.80
UGT1A9	rs17868320	Chr2	0.03	p= 0.88
IMPDH2	rs11557543	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557547	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557541	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557545	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557542	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557544	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11706052	Chr3	0.23	p= 0.19
IMPDH2	rs11557546	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557540	Chr3	0	---
IMPDH2	rs1049818	Chr3	0	---

Table 2. Eterozigosità (HET) ed equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) nel gruppo Controllo I.

GENE	SNP	CHROMOSOME	HET observed	HWE p value
IL-10	rs1800872	Chr1	0.44	p= 0.90
TNF α	rs1800629	Chr6	0.26	p= 0.68
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	0.39	p= 0.13
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	0.43	p= 0.33
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	0.49	p= 0.81
UGT1A9	rs2741045	Chr2	0.41	p= 0.82
UGT1A9	rs2741046	Chr2	0.40	p= 0.92
UGT1A9	rs6714486	Chr2	0.09	p= 0.71
UGT1A9	rs17868320	Chr2	0.07	p= 0.76
IMPDH2	rs11557543	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557547	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557541	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557545	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557542	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557544	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11706052	Chr3	0.14	p= 0.52
IMPDH2	rs11557546	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557540	Chr3	0	---
IMPDH2	rs1049818	Chr3	0	---

Table 3. Eterozigosità (HET) ed equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) nel gruppo Controllo II.

GENE	SNP	CHROMOSOME	HET observed	HWE p value
IL-10	rs1800872	Chr1	0.32	p= 0.75
TNF α	rs1800629	Chr6	0.17	p= 0.42
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	0.54	p= 0.30
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	0.49	p= 0.25
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	0.61	p= 0.01
UGT1A9	rs2741045	Chr2	0.34	p= 0.62
UGT1A9	rs2741046	Chr2	0.34	p= 0.62
UGT1A9	rs6714486	Chr2	0.03	p= 0.93
UGT1A9	rs17868320	Chr2	0.05	p= 0.87
IMPDH2	rs11557543	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557547	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557541	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557545	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557542	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557544	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11706052	Chr3	0.22	p= 0.65
IMPDH2	rs11557546	Chr3	0	---
IMPDH2	rs11557540	Chr3	0	---
IMPDH2	rs1049818	Chr3	0	---

Table 4. Eterozigosità (HET) ed equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE) nel gruppo Casi.

Frequenze alleliche

Le frequenze alleliche dei tre gruppi studiati sono riportate nella Tabella 5 (in grassetto è evidenziato l'allele ancestrale) e risultano essere sovrapponibili tra loro; per confronto, sono anche riportate le frequenze alleliche delle popolazioni europea e mondiale (Ensembl), anch'esse analogamente distribuite.

Si evince inoltre che tutti gli SNPs del gene IMPDH2 (tranne rs11706052) sono rappresentati da una sola variante allelica (100% di frequenza relativa ad un unico allele).

GENE	SNP	CHROMOSOME	ALLELE	EUROPE	ALL	CASE	CONTROLLI I	CONTROLLI II
IL-10	rs1800872	Chr1	G T	76% 24%	57% 43%	82% 18%	75% 25%	68% 32%
TNF α	rs1800629	Chr6	G A	87% 13%	91% 9%	89% 11%	88% 12%	86% 14%
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	G T A	57% 41% 2%	62% 33% 5%	71% 27% 2%	64% 35% 1%	60% 40% ---
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	C T	58% 42%	58% 42%	71% 29%	63% 37%	59% 41%
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	C T	48% 52%	60% 40%	67% 33%	56% 44%	50% 50%
UGT1A9	rs2741045	Chr2	C T	73% 27%	84% 16%	80% 20%	71% 29%	69% 31%
UGT1A9	rs2741046	Chr2	T C	73% 27%	84% 16%	80% 20%	71% 29%	73% 27%
UGT1A9	rs6714486	Chr2	T A	95% 5%	93% 7%	99% 1%	98% 2%	96% 4%
UGT1A9	rs17868320	Chr2	C T	95% 5%	98% 2%	97% 3%	99% 1%	96% 4%
IMPDH2	rs11557543	Chr3	G	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11557547	Chr3	T	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11557541	Chr3	G	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11557545	Chr3	G	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11557542	Chr3	A	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11557544	Chr3	G	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11706052	Chr3	A G	88% 12%	95% 5%	86% 14%	89% 11%	93% 7%
IMPDH2	rs11557546	Chr3	G	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs11557540	Chr3	T	100%	100%	100%	100%	100%
IMPDH2	rs1049818	Chr3	G	100%	100%	100%	100%	100%

Table 5. Frequenze alleliche.

Frequenze genotipiche

Le frequenze dei genotipi determinate nei tre gruppi studiati sono sovrapponibili tra loro, il genotipo maggiormente rappresentato in un gruppo lo è anche negli altri (Tabella 6).

Inoltre, si evidenzia che nessun paziente con evento di rigetto acuto risulta eterozigote A/T per lo SNP rs2032582 del gene ABCB1/MDR1. Nessun donatore sano risulta essere eterozigote A/G e A/T per lo SNP rs2032582 appartenente al gene ABCB1/MDR1. Nel gruppo controllo I e nel gruppo controllo II nessun soggetto risulta omozigote G/G per lo SNP rs11706052 del gene IMPDH2.

GENE	CHROMOSOME	SNP	GENOTYPE	CASE (Frequency)	CONTROL I (Frequency)	CONTROL II (Frequency)
IL-10	Chr1	rs1800872	G/G	66%	68%	46%
			G/T	32%	29%	44%
			T/T	3%	3%	10%
TNF α	Chr6	rs1800629	G/G	88%	83%	73%
			A/G	17%	16%	26%
			A/A	2%	2%	1%
ABCB1/MDR1	Chr7	rs2032582	G/T	49%	45%	39%
			G/G	44%	40%	41%
			T/T	2%	12%	20%
			A/G	5%	2%	---
			A/T	---	1%	---
ABCB1/MDR1	Chr7	rs1128503	C/T	49%	50%	43%
			C/C	46%	38%	37%
			T/T	5%	12%	20%
ABCB1/MDR1	Chr7	rs1045642	C/T	61%	53%	48%
			C/C	37%	30%	26%
			T/T	2%	17%	26%
UGT1A9	Chr2	rs2741045	C/C	63%	52%	49%
			C/T	34%	36%	41%
			T/T	3%	11%	10%
UGT1A9	Chr2	rs2741046	T/T	63%	53%	53%
			C/T	34%	36%	40%
			C/C	3%	11%	7%
UGT1A9	Chr2	rs6714486	T/T	97%	95%	91%
			A/T	3%	5%	9%
UGT1A9	Chr2	rs17868320	C/C	95%	97%	93%
			C/T	5%	3%	7%
IMPDH2	Chr3	rs11557543	G/G	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11557547	T/T	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11557541	G/G	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11557545	G/G	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11557542	A/A	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11557544	G/G	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11706052	A/A	75%	77%	86%
			G/A	22%	23%	14%
			G/G	3%	---	---
IMPDH2	Chr3	rs11557546	G/G	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs11557540	T/T	100%	100%	100%
IMPDH2	Chr3	rs1049818	G/G	100%	100%	100%

Table 6. Frequenze genotipiche.

Associazioni genetiche

È stata effettuata l'analisi *per-allele*, *per-genotype* e *linear trend* per tutti i polimorfismi nei tre gruppi studiati. I risultati sono riportati nelle tabelle sotto: non si evidenziano differenze statisticamente significative confrontando le frequenze alleliche del gruppo Casi verso il gruppo Controllo I ($p > 0.05$). (Tabella 7).

Nemmeno raggruppando i pazienti trapiantati (gruppo Casi + Controllo I) e confrontandoli con il gruppo Controllo II si evidenzia una differenza statisticamente significativa ($p > 0.05$) (Tabella 8).

Dal momento che i pazienti trapiantati appartenenti al gruppo Controllo I potrebbero rigettare l'organo, è stato effettuato il confronto anche tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo II (Tabella 9) dove sono evidenti delle differenze statisticamente significative per i seguenti SNPs appartenenti al gene ABCB1/MDR1: rs1045642 (*per-genotype* $p = 0.01$, *per-allele* $p = 0.01$ e *trend test* $p = 0.01$) and rs2032582 (*per-genotype* $p = 0.02$, *per-allele* $p = 0.03$ and *trend test* $p = 0.04$). Per quest'ultimo polimorfismo i p-value erano molto maggiori di 0.05 nelle analisi tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo I (*per-genotype* $p = 0.35$, *per-allele* $p = 0.36$ e *trend test* $p = 0.35$).

Analogamente, è evidente un simile fenomeno per lo SNP rs1800872 appartenente al gene dell'IL10 confrontato il gruppo di tutti i pazienti trapiantati (Casi + Controllo I) e gli individui sani (Controllo II), indicando che i pazienti con il genotipo G/G potrebbero con maggiore probabilità andare incontro a malattia renale cronica (CKD).

GENE	SNP	CHROMOSOME	p-value per Genotype analysis	p-value per Allele analysis	p-value Linear Trend analysis
IL-10	rs1800872	Chr1	$p = 0.41$	$p = 0.23$	$p = 0.25$
TNF α	rs1800629	Chr6	$p = 0.62$	$p = 0.80$	$p = 0.80$
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	$P = 0.35$	$p = 0.36$	$p = 0.35$
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	$p = 0.36$	$p = 0.21$	$p = 0.19$
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	$p = 0.05$	$p = 0.09$	$p = 0.07$
UGT1A9	rs2741045	Chr2	$p = 0.23$	$p = 0.10$	$p = 0.12$
UGT1A9	rs2741046	Chr2	$p = 0.23$	$p = 0.10$	$p = 0.12$
UGT1A9	rs6714486	Chr2	$p = 0.59$	$p = 0.59$	$p = 0.59$
UGT1A9	rs17868320	Chr2	$p = 0.45$	$p = 0.45$	$p = 0.45$
IMPDH2	rs11706052	Chr3	$p = 0.24$	$p = 0.62$	$p = 0.60$

Table 7. Associazioni genetiche tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo I. Per il gene IMPDH2 è stato riportato solo rs11706052, poiché la mancanza di eterozigotità non rende possibile l'esecuzione dei test per gli altri SNPs.

GENE	SNP	CHROMOSOME	p-value per Genotype analysis	p-value per Allele analysis	p-value Linear Trend analysis
IL-10	rs1800872	Chr1	p= 0.13	p= 0.06	p= 0.06
TNF α	rs1800629	Chr6	p= 0.71	p= 0.45	p= 0.45
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	P= 0.12	p= 0.13	p= 0.14
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	p= 0.13	p= 0.19	p= 0.18
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	p= 0.07	p= 0.07	p= 0.06
UGT1A9	rs2741045	Chr2	p= 0.66	p= 0.40	p= 0.42
UGT1A9	rs2741046	Chr2	p= 0.80	p= 0.96	p= 0.96
UGT1A9	rs6714486	Chr2	p= 0.18	p= 0.19	p= 0.18
UGT1A9	rs17868320	Chr2	p= 0.23	p= 0.23	p= 0.22
IMPDH2	rs11706052	Chr3	p= 0.29	p= 0.13	p= 0.12

Table 8. Associazioni genetiche tra tutti i pazienti trapiantati (Casi + Controllo I) e gli individui sani (Controllo II). Per il gene IMPDH2 è stato riportato solo rs11706052, poiché la mancanza di eterozigotità non rende possibile l'esecuzione dei test per gli altri SNPs.

GENE	SNP	CHROMOSOME	p-value per Genotype analysis	p-value per Allele analysis	p-value Linear Trend analysis
IL-10	rs1800872	Chr1	p= 0.10	p= 0.03	p= 0.03
TNF α	rs1800629	Chr6	p= 0.55	p= 0.48	p= 0.48
ABCB1/MDR1	rs2032582	Chr7	P= 0.02	p= 0.03	p= 0.04
ABCB1/MDR1	rs1128503	Chr7	p= 0.09	p= 0.07	p= 0.07
ABCB1/MDR1	rs1045642	Chr7	p= 0.01	p= 0.01	p= 0.01
UGT1A9	rs2741045	Chr2	p= 0.21	p= 0.08	p= 0.08
UGT1A9	rs2741046	Chr2	p= 0.45	p= 0.23	p= 0.22
UGT1A9	rs6714486	Chr2	p= 0.23	p= 0.24	p= 0.23
UGT1A9	rs17868320	Chr2	p= 0.73	p= 0.73	p= 0.73
IMPDH2	rs11706052	Chr3	p= 0.23	p= 0.13	p= 0.13

Table 9. Associazioni genetiche tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo II. Per il gene IMPDH2 è stato riportato solo rs11706052, poiché la mancanza di eterozigotità non rende possibile l'esecuzione dei test per gli altri SNPs.

DISCUSSIONE

Nella ricerca biomedica la stima della numerosità campionaria assicura che il numero di soggetti/pazienti coinvolti nello studio clinico, a prescindere dalla sua tipologia, permetta di raccogliere informazioni importanti, per poter rispondere adeguatamente al quesito di interesse [51]. A tal riguardo nel nostro progetto di ricerca, durante la fase di disegno dello studio è stata determinata una numerosità campionaria di 69 soggetti per gruppo, attraverso l'utilizzo del *sample size test*. Entrambi i gruppi di controllo superano la soglia minima di soggetti (109 per il gruppo controllo I e 70 per il gruppo controllo II), mentre il gruppo casi non ha raggiunto la numerosità campionaria prevista (41 pazienti). La scarsa presenza di pazienti trapiantati renali arruolati nel nostro progetto, che ha portato a non soddisfare i requisiti del *sample size test* per il gruppo casi, potrebbe essere dovuta a diversi fattori:

- Numero limitato di trapianti: il centro trapianti dell'Ospedale di Vicenza è classificato come medio-piccolo;
- Numero limitato di individui trapiantati che vanno incontro ad evento di rigetto acuto;
- Mancata sottoscrizione al consenso informato.

Analizzando le caratteristiche della nostra popolazione risulta esserci una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda la variabile sesso ($p=0.0028$) e la variabile età ($p=0.0123$) all'interno dei tre gruppi.

In particolare, si evidenzia una maggior tendenza da parte dei pazienti maschi ad essere sottoposti al trapianto renale, rispetto alle pazienti femmine. Questo dato viene supportato da quanto riportato in letteratura, in cui è nota una maggiore prevalenza italiana di CKD nel genere maschile rispetto a quello femminile e quindi una maggiore possibilità di evoluzione della patologia renale nei maschi piuttosto che nelle femmine [52]. Esistono comunque pareri contrastanti per quanto riguarda la correlazione tra la differenza di genere e la progressione della CKD: a favore [53,54] e contrari [55]. Pertanto vista la stessa differenza di genere nel gruppo casi potremmo ipotizzare che i pazienti maschi siano più soggetti all'evento rigetto acuto rispetto alle pazienti femmine.

Nella nostra popolazione quasi tutti i polimorfismi si trovano in equilibrio di Hardy-Weinberg (HWE). Secondo il principio dell'equilibrio di Hardy Weinberg, le frequenze alleliche e quelle

genotipiche rimangono costanti di generazione in generazione se si verificano le seguenti condizioni:

- la popolazione risulta di grandi dimensioni;
- si verifica un incrocio o accoppiamento casuale tra gli individui (altrimenti si avrebbe “l’effetto del fondatore”);
- gli individui di sesso maschile hanno frequenze alleliche simili a quelli di sesso femminile;
- assenza di nuove mutazioni, migrazione, deriva genetica e selezione naturale [47].

Quando un locus bialelico mostra uno scostamento dall’HWE, significa che uno o più delle precedenti assunzioni di HWE siano state violate. Questo è il caso dello SNP rs1045642 del gene ABCB1/MDR1, il cui p-value per HWE è minore di 0,05 ($p=0,01$).

Nel nostro studio non sono evidenti differenze statisticamente significative nel confronto tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo I, tuttavia i pazienti con evento di rigetto acuto hanno una frequenza dell’allele C del 67% nello SNP rs1045642 del gene ABCB1/MDR1. Inoltre, questo SNP non risulta in equilibrio di Hardy-Weimberg. Potrebbe esserci una correlazione? La violazione dell’HWE potrebbe essere dovuta ad una maggior suscettibilità allo sviluppo di rigetto per i portatori dell’allele C? Com’è noto il gene ABCB1/MDR1 codifica per una pompa di efflusso transmembrana, in grado di estromettere numerosi composti xenobiotici, compresi i farmaci utilizzati per la terapia immunosoppressiva di prevenzione del rigetto acuto da trapianto renale. Studi in letteratura su diversi trattamenti farmacologici, evidenziano che i portatori dei genotipi C/C e C/T siano considerati **high pumpers** e caratterizzati da un’attività maggiore della pompa, rispetto ai soggetti con genotipo T/T, definiti **low pumpers** [56]. Infatti la ridotta attività di ABCB1/MDR1, correlata alla variante T, si associa ad aumento significativo della concentrazione di CsA intracellulare, esponendo i pazienti ad un aumentato rischio di tossicità, dovuto all’accumulo del farmaco [57]. Altre pubblicazioni riportano che un aumento dell’attività della P-glicoproteina, comporti una ridotta esposizione intracellulare dei linfociti T alla CsA, la quale non svolgendo la sua azione inibitoria, si associa ad un evento di rigetto acuto [58].

Analogamente, ritroviamo la stessa ipotesi negli studi di trapianto polmonare, per le quali le forme alleliche C/C e C/T sembrerebbero maggiormente correlate all’evento di rigetto acuto persistente rispetto alla variante T/T [59], e negli studi sulle patologie neurodegenerative, in cui la cui variabile C sembra comportare un maggior rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer [60]. Nonostante la

questione risulti ancora molto controversa, i nostri risultati sembrano confermare tale trend (allele C di rischio). Solo l'aumento della numerosità campionaria ci permetterà di avvalorare questa ipotesi. Le frequenze alleliche osservate sono distribuite in modo omogeneo all'interno dei gruppi oggetto di studio. In particolare il gruppo di controllo II (soggetti sani) è in linea con i dati riportati in letteratura per la popolazione europea e quella mondiale (Ensembl), quindi si può assumere che la nostra popolazione di controlli sani sia rappresentativa. Analogamente è stato osservato per le frequenze genotipiche.

Non sembra risultare alcuna differenza statisticamente significativa dall'analisi delle associazioni genetiche tra gli individui del gruppo casi e gli individui del gruppo controllo I, condotta con i tre test: "*per-genotype*" analysis, "*per-allele*" analysis e "*linear trend*" analysis. Si è ipotizzato che tale effetto possa essere dovuto alla scarsa numerosità campionaria del gruppo casi.

Nemmeno raggruppando i pazienti trapiantati (gruppo Casi + Controllo I) e confrontandoli con il gruppo Controllo II si evidenzia una differenza statisticamente significativa; tuttavia, dal momento che i pazienti trapiantati appartenenti al gruppo Controllo I potrebbero rigettare l'organo, è stato effettuato il confronto anche tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo II dove sono evidenti delle differenze statisticamente significative per gli SNPs rs1045642 e rs2032582 appartenenti al gene ABCB1/MDR1. Per quest'ultimo polimorfismo i p-value erano molto maggiori di 0.05 nelle analisi tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo I diventando poi significativi nell'analisi tra il gruppo Casi e il gruppo Controllo II. Questa evidenza sottolinea come la presenza del gruppo di Controllo II permetta di effettuare un confronto con il gruppo Casi senza essere influenzati dalla presenza, nel gruppo Controllo I, di pazienti trapiantati che potrebbero rigettare l'organo. Infatti nel gruppo Controllo I, rappresentato da 109 pazienti, solo 3 presentano l'allele di rischio (G/G).

Analogamente, è evidente un simile fenomeno per lo SNP rs1800872 appartenente al gene dell'IL10 confrontando il gruppo di tutti i pazienti trapiantati (Casi + Controllo I) e gli individui sani (Controllo II), indicando che i pazienti con il genotipo G/G potrebbero con maggiore probabilità andare incontro a malattia renale cronica (CKD).

Il prodotto del gene IMPDH2 è un enzima responsabile della sintesi de novo dei nucleotidi guaninici ed risulta essere il target dell'acido micofenolico utilizzato come immunosoppressore. Il nostro studio non sembra indicare alcuna differenza statisticamente significativa tra tutti i polimorfismi di IMPDH2 studiati e l'aumentato rischio di rigetto acuto nei pazienti trapiantati di rene, come viene dimostrato anche in altri studi [25,32,61,62]. Altri autori, invece, trovano una correlazione tra la variante allelica C nello SNP rs11706052 e una riduzione nella risposta all'acido micofenolico (MPA), in comparazione con il genotipo T/T [63]. Per tutti gli SNPs appartenenti al

gene IMPDH2, ad eccezione dell'rs11706052, vi è la presenza di un locus monoallelico. Questo è confermato dai dati aggiornati recentemente e presenti nel database mondiale (Ensembl) e da alcuni studi [64] suggerendo la presenza di artefatti dovuti al sequenziamento effettuato con metodi meno sofisticati.

Il gene UGT1A9 codifica per un enzima in grado di rendere il farmaco MPA maggiormente idrofilo e facilmente eliminabile, grazie all'esterificazione con all'acido glucuronico, abbattendo la sua concentrazione ematica e quindi la sua efficacia. Contrariamente a quanto riportato in letteratura [65,66], il nostro studio non evidenzia alcuna correlazione tra le varianti polimorfiche studiate di UGT1A9 e l'evento di rigetto acuto.

IL-10 e TNF- α sono due importanti citochine coinvolte nei processi infiammatori: la prima ha un'azione immunomodulante, la seconda ha un'azione pro-infiammatoria. Sebbene alcune evidenze scientifiche riportino un decremento dei livelli ematici di IL-10 post-trapianto come conseguenza dell'immunosoppressione [67], la maggior parte degli studi che correlano la presenza di varianti negli SNP del gene TNF- α e IL-10 con un maggior rischio di rigetto acuto nei soggetti trapiantati non dimostrano alcuna differenza statisticamente significativa, [68-71] in concordanza con il nostro studio.

Nonostante i risultati preliminari, questo progetto non può dichiararsi concluso poiché solo quando la numerosità campionaria verrà raggiunta sarà possibile trarre delle conclusioni definitive. È infatti attiva una collaborazione con il Dipartimento di Nefrologia dell'azienda ospedaliera di Udine, grazie alla quale è in corso il reclutamento di nuovi pazienti trapiantati con evento di rigetto acuto di rene.

Le prospettive per il futuro sono:

- procedere con l'analisi genetica dei pazienti arruolati presso il centro trapianti di Udine;
- analizzare altri polimorfismi che in letteratura sembrano connessi con un maggior rischio di rigetto renale. E' in corso l'analisi del gene IMPDH1 che è fortemente correlato con la proliferazione cellulare. Analogamente all'IMPDH2, esso codifica per un enzima coinvolto nella sintesi de novo dei nucleotidi guaninici. IMPDH1 è stato scelto perché risulta essere uno dei target dell'MPA. In diversi studi le sue varianti genotipiche a livello degli SNP rs2278293 e rs2278294 sembrano riportare un'associazione con l'evento di rigetto acuto di rene [61,72,73];
- possibilità di valutare in vivo come varia il rapporto dose/effetto di alcuni farmaci immunosoppressori in relazione alle diverse varianti genotipiche dello SNP rs1045642 per il gene ABCB1/MDR1 nei soggetti trapiantati;

- studiare i profili genetici anche nei donatori in quanto è stato dimostrato che lo SNP rs1800872 nel gene IL10 risulta essere associato con l'evento di rigetto acuto nei riceventi [74];
- realizzare degli studi di espressione, per valutare come possa agire la variante a livello fenotipico.

BIBLIOGRAFIA

1. [Http://kdigo.Org/home/guidelines/ckd-evaluation-management/](http://kdigo.org/home/guidelines/ckd-evaluation-management/), 2012,
2. [Http://www2.Kidney.Org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p4_class_g1.Htm](http://www2.Kidney.Org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p4_class_g1.Htm). 2002
3. Coresh J, Stevens LA: Kidney function estimating equations: Where do we stand? Current opinion in nephrology and hypertension 2006;15:276-284.
4. G. Fuiano CZ, B. Cianciaruso: Linee guida per la terapia conservativa dell'insufficienza renale cronica. Giornale Italiano di Nefrologia 2003:S48-S60.
5. De Nicola L, Donfrancesco C, Minutolo R, Lo Noce C, De Curtis A, Palmieri L, Iacoviello L, Conte G, Chiodini P, Sorrentino F, Coppo R, Vanuzzo D, Scherillo M, Giampaoli S: [epidemiology of chronic kidney disease in italy: Current state and contribution of the carhes study]. Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia 2011;28:401-407.
6. De Nicola L, Dal Canton A: [epidemiology of chronic kidney disease in italy: The carhes study]. G Ital Cardiol (Rome) 2010;11:106S-108S.
7. Garofalo C, Liberti ME, Saggiocca A, Michini C, Palmisano R, Pirro L, Provenzano M, Minutolo R, De Nicola L, Conte G: [epidemiology and prognosis of chronic kidney disease in italy]. Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia 2012;29 Suppl 58:S3-11.
8. F. P. Schena FPS, L. Gesualdo, M. Battaglia: Malattie dei reni e delle vie urinarie 2008, pp 414-450.
9. G. Garibotto RP: Manuale di nefrologia. 2012.
10. Danovitch GM: Handbook of kidney transplantation. 2012.
11. Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ: Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the united states to the year 2010. Journal of the American Society of Nephrology : JASN 2001;12:2753-2758.
12. Kasiske BL, Cangro CB, Hariharan S, Hricik DE, Kerman RH, Roth D, Rush DN, Vazquez MA, Weir MR: The evaluation of renal transplantation candidates: Clinical practice guidelines. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2001;1 Suppl 2:3-95.
13. Spithoven EM, Kramer A, Meijer E, Orskov B, Wanner C, Caskey F, Collart F, Finne P, Fogarty DG, Groothoff JW, Hoitsma A, Nogier MB, Postorino M, Ravani P, Zurriaga O, Jager KJ, Gansevoort RT: Analysis of data from the era-edta registry indicates that conventional treatments for chronic kidney disease do not reduce the need for renal replacement therapy in autosomal dominant polycystic kidney disease. Kidney international 2014;86:1244-1252.
14. Suthanthiran M, Strom TB: Renal transplantation. The New England journal of medicine 1994;331:365-376.

15. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK: Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *The New England journal of medicine* 1999;341:1725-1730.
16. [Http://www.Trapianti.Salute.Gov.It/](http://www.Trapianti.Salute.Gov.It/).
17. C. P: Medical complications of kidney transplantation. 2007.
18. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M: Banff 07 classification of renal allograft pathology: Updates and future directions. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2008;8:753-760.
19. [Http://srtr.Transplant.Hrsa.Gov/annual_reports/2011/default.aspx](http://srtr.Transplant.Hrsa.Gov/annual_reports/2011/default.aspx).
20. Zaza G, Granata S, Mangino M, Grandaliano G, Schena FP: [from pharmacogenetics to pharmacogenomics: The start of a new era of personalized medicine in nephrology]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia* 2010;27:353-366.
21. Caletti C, Granata S, Tomei P, Dalla Gassa A, Lupo A, Zaza G: [pharmacogenetics: A promising tool to personalize immunosuppressive therapy in renal transplantation]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia* 2015;32
22. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH: Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 1999;353:1083-1091.
23. Halloran PF: Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine* 2004;351:2715-2729.
24. Fekete A, Viklicky O, Hubacek JA, Rusai K, Erdei G, Treszl A, Vitko S, Tulassay T, Heemann U, Reusz G, Szabo AJ: Association between heat shock protein 70s and toll-like receptor polymorphisms with long-term renal allograft survival. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2006;19:190-196.
25. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, Rashford M, Nasmyth-Miller C, Voulgari A, Spleiss O, Truman M, Essieux L: Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2008;21:879-891.
26. Kruger B, Boger CA, Schroppel B, Obed A, Hoffmann U, Murphy BT, Fischeder M, Holler E, Banas B, Kramer BK: Impact of nod2/card15 haplotypes on the outcome after kidney transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2007;20:600-607.
27. Koene RA: Clinical aspects of renal transplantation. *Radiologia clinica* 1978;47:6-9.

28. Marder B, Schroppel B, Murphy B: Genetic variability and transplantation. *Current opinion in urology* 2003;13:81-89.
29. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ: Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-cd3/cd28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001;72:1444-1450.
30. Marshall SE, Welsh KI: The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation. *Genes and immunity* 2001;2:297-303.
31. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C: Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger rna and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711-717.
32. Pazik J, Oldak M, Podgorska M, Lewandowski Z, Sitarek E, Ploski R, Szmidt J, Chmura A, Durlik M, Malejczyk J: Lymphocyte counts in kidney allograft recipients are associated with *impdh2 3757t>c* gene polymorphism. *Transplantation proceedings* 2011;43:2943-2945.
33. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB: Kidney transplantation: Mechanisms of rejection and acceptance. *Annual review of pathology* 2008;3:189-220.
34. Refseq-ncbi, 2011,
35. Evans WE, McLeod HL: Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *The New England journal of medicine* 2003;348:538-549.
36. Ebrahimi A, Rahim F: Recent immunomodulatory strategies in transplantation. *Immunological investigations* 2014;43:829-837.
37. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, Stryke D, Ferrin TE, DeYoung J, Taylor T, Carlson EJ, Herskowitz I, Giacomini KM, Clark AG: Sequence diversity and haplotype structure in the human *abcb1* (*mdr1*, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003;13:481-494.
38. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M: *Cyp3a4*, *cyp3a5*, and *mdr-1* genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics* 2006;16:659-665.
39. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, Miura M, Suzuki T, Kato T, Habuchi T: Impact of *cyp3a5* and *mdr1(abcb1) c3435t* polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation proceedings* 2005;37:1730-1732.
40. Johnson AG, Rigby RJ, Taylor PJ, Jones CE, Allen J, Franzen K, Falk MC, Nicol D: The kinetics of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in adult kidney transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1999;66:492-500.
41. Kuypers DR, Naesens M, Vermeire S, Vanrenterghem Y: The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1a9 (*ugt1a9*) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms t-275a and c-

- 2152t on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2005;78:351-361.
42. Sanchez-Fructuoso AI, Maestro ML, Calvo N, Viudarreta M, Perez-Flores I, Veganzone S, De la Orden V, Ortega D, Arroyo M, Barrientos A: The prevalence of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1a9 (ugt1a9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms t-275a and c-2152t and its influence on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant patients. *Transplantation proceedings* 2009;41:2313-2316.
43. Glander P, Hambach P, Braun KP, Fritsche L, Giessing M, Mai I, Einecke G, Waiser J, Neumayer HH, Budde K: Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2004;4:2045-2051.
44. Goldman AD, Landweber LF: What is a genome? *PLoS genetics* 2016;12:e1006181.
45. MI BK: *Genetica e genomica umana*. 2013.
46. RF W: *Biologia molecolare*. 2009.
47. RJ B: *Principi di genetica*. 2010
48. D C: *Antropologia molecolare - manuale di base*. 2009
49. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR., Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME: Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006;444:444-454.
50. R L: *Genetica umana - concetti e applicazioni*. 2010
51. Hazra A, Gogtay N: Biostatistics series module 5: Determining sample size. *Indian journal of dermatology* 2016;61:496-504.
52. Kang DH, Yu ES, Yoon KI, Johnson R: The impact of gender on progression of renal disease: Potential role of estrogen-mediated vascular endothelial growth factor regulation and vascular protection. *The American journal of pathology* 2004;164:679-688.
53. Neugarten J, Acharya A, Silbiger SR: Effect of gender on the progression of nondiabetic renal disease: A meta-analysis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2000;11:319-329.
54. Seliger SL, Davis C, Stehman-Breen C: Gender and the progression of renal disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2001;10:219-225.
55. Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, Toto R, Remuzzi G, Ruggenti P, Marcantoni C, Becker G, Shahinfar S, De Jong PE, De Zeeuw D, Kamper AL, Strangard S, Levey AS: The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: A patient-level meta-analysis. *Nephrology*,

dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association 2003;18:2047-2053.

56. Llaudo I, Colom H, Gimenez-Bonafe P, Torras J, Caldes A, Sarrias M, Cruzado JM, Oppenheimer F, Sanchez-Plumed J, Gentil MA, Ekberg H, Grinyo JM, Lloberas N: Do drug transporter (abcb1) snps and p-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2013;26:177-186.

57. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Ansermot N, Fathi M, Pascual M, Eap CB: Influence of abcb1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics* 2008;18:307-315.

58. Falck P, Asberg A, Guldseth H, Bremer S, Akhlaghi F, Reubsæet JL, Pfeffer P, Hartmann A, Midtvedt K: Declining intracellular t-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008;85:179-184.

59. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Webber S, Ristich J, Zhang J, Iacono A, Dauber J, McDade K, Zaldonis D, Lamba J, Burckart GJ: The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transplant immunology* 2005;14:37-42.

60. Zhong X, Liu MY, Sun XH, Wei MJ: Association between abcb1 polymorphisms and haplotypes and alzheimer's disease: A meta-analysis. *Scientific reports* 2016;6:32708.

61. Gensburger O, Van Schaik RH, Picard N, Le Meur Y, Rousseau A, Woillard JB, Van Gelder T, Marquet P: Polymorphisms in type i and ii inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenetics and genomics* 2010;20:537-543.

62. Shah S, Harwood SM, Dohler B, Opelz G, Yaqoob MM: Inosine monophosphate dehydrogenase polymorphisms and renal allograft outcome. *Transplantation* 2012;94:486-491.

63. Oetting WS, Schladt DP, Leduc RE, Jacobson PA, Guan W, Matas AJ, Israni A: Validation of single nucleotide polymorphisms associated with acute rejection in kidney transplant recipients using a large multi-center cohort. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2011;24:1231-1238.

64. Mohamed MF, Frye RF, Langaee TY: Interpopulation variation frequency of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type ii (impdh2) genetic polymorphisms. *Genetic testing* 2008;12:513-516.

65. Vu D, Tellez-Corrales E, Yang J, Qazi Y, Shah T, Naraghi R, Hutchinson IV, Min DI: Genetic polymorphisms of ugt1a8, ugt1a9 and hnf-1alpha and gastrointestinal symptoms in renal transplant recipients taking mycophenolic acid. *Transplant immunology* 2013;29:155-161.

66. Baldelli S, Merlini S, Perico N, Nicastrì A, Cortinovis M, Gotti E, Remuzzi G, Cattaneo D: C-440t/t-331c polymorphisms in the ugt1a9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 2007;8:1127-1141.

67. Chung BH, Kim KW, Yu JH, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, Cho ML, Yang CW: Decrease of immature b cell and interleukin-10 during early-post-transplant period in renal transplant recipients under tacrolimus based immunosuppression. *Transplant immunology* 2014;30:159-167.
68. Chen Z, Bouamar R, Van Schaik RH, De Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, Budde K, Kuypers DR, Weimar W, Hesselink DA, Van Gelder T: Genetic polymorphisms in il-2, il-10, tgf-beta1, and il-2rb and acute rejection in renal transplant patients. *Clinical transplantation* 2014;28:649-655.
69. Mandegary A, Azmandian J, Soleymani S, Pootari M, Habibzadeh SD, Ebadzadeh MR, Dehghani-Firouzabadi MH: Effect of donor tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes on delayed graft function and acute rejection in kidney transplantation. *Iranian journal of kidney diseases* 2013;7:135-141.
70. Gaafar A, Iqniebi A, Sheereen A, Eldali A, Turpeinen H, Adra C, Al Meshari K, Al Hussein K: Study of the cytokine polymorphisms in correlation to rejection and graft survival in renal allograft donors and recipients from a homogenous saudi population. *Transplant immunology* 2014;30:34-39.
71. Xiong J, Wang Y, Zhang Y, Nie L, Wang D, Huang Y, Feng B, Zhang J, Zhao J: Lack of association between interleukin-10 gene polymorphisms and graft rejection risk in kidney transplantation recipients: A meta-analysis. *PloS one* 2015;10:e0127540.
72. Kagaya H, Miura M, Saito M, Habuchi T, Satoh S: Correlation of impdh1 gene polymorphisms with subclinical acute rejection and mycophenolic acid exposure parameters on day 28 after renal transplantation. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2010;107:631-636.
73. Wang J, Yang JW, Zeevi A, Webber SA, Girnita DM, Selby R, Fu J, Shah T, Pravica V, Hutchinson IV, Burckart GJ: Impdh1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2008;83:711-717.
74. Reimers M, Castro JR, Linstadt D, Collier JM, Henderson S, Hannigan J, Phillips TL: Heavy charged particle therapy of bone and soft tissue sarcoma. A phase i-ii trial of the university of california lawrence berkeley laboratory and the northern california oncology group. *American journal of clinical oncology* 1986;9:488-493.