

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE  
Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali  
Corso di Laurea in Scienze Biologiche  
Anno Accademico 2004-2005

**"Polimorfismi VDR in pazienti uremici  
normoglicemici e diabetici"**

CANDIDATO: Tommaso Rondelli

RELATORE: Prof. Marco Ruggiero

CORRELATORE: Dott.ssa Stefania Pacini

# Insufficienza Renale Cronica

Col termine *Uremia* ci si riferisce in senso generale all'insieme di segni e sintomi associati all'insufficienza renale cronica (**IRC**), indipendentemente dalla sua causa.

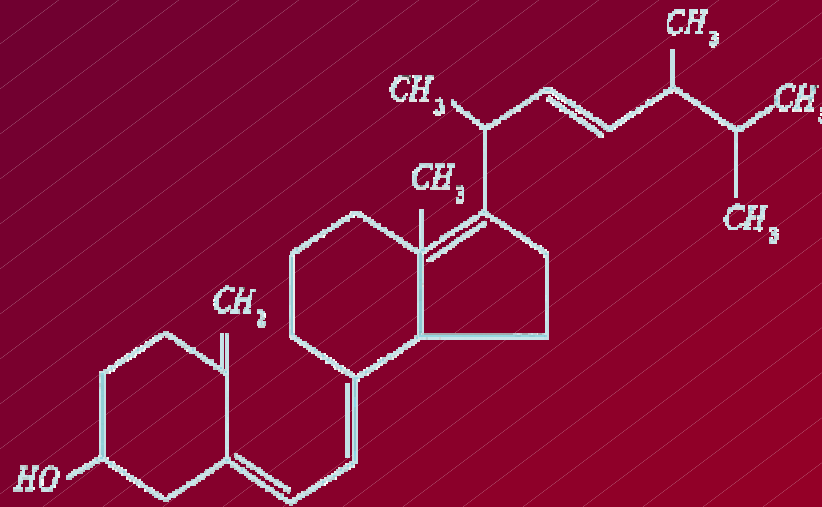
# Diagnosi di IRC

- Riduzione significativa del FGR negli ultimi 3-6 mesi;
- Radiografie, ecografie, urografie o tomografie qualora dimostrino le ridotte dimensioni di entrambi i reni;
- Parametri ematochimici caratteristici considerati indici attendibili della cronicità della malattia (ipercreatininemia e iperazotemia).

# Effetti dell'Uremia

Il malfunzionamento dei reni porta, tra le numerose conseguenze (alterazioni cardiovascolari, ematologiche, dermatologiche, gastrointestinali, neuromuscolari) ad una riduzione della sintesi dell' **1,25 diidrossivitamina D<sub>3</sub>**: questo determina alterazioni nel metabolismo fosfo-calcico, nella sintesi e secrezione di PTH, nel sistema renina-angiotensina, nella proliferazione e differenziazione cellulare.

# Vitamina D<sub>3</sub>



L' *1,25 diidrossivitamina D<sub>3</sub>* ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ) è la forma biologicamente attiva della vitamina D<sub>3</sub>; essa viene trasportata verso gli organi bersaglio legata alla vitamina D-binding protein, si lega al proprio recettore e svolge le proprie funzioni.

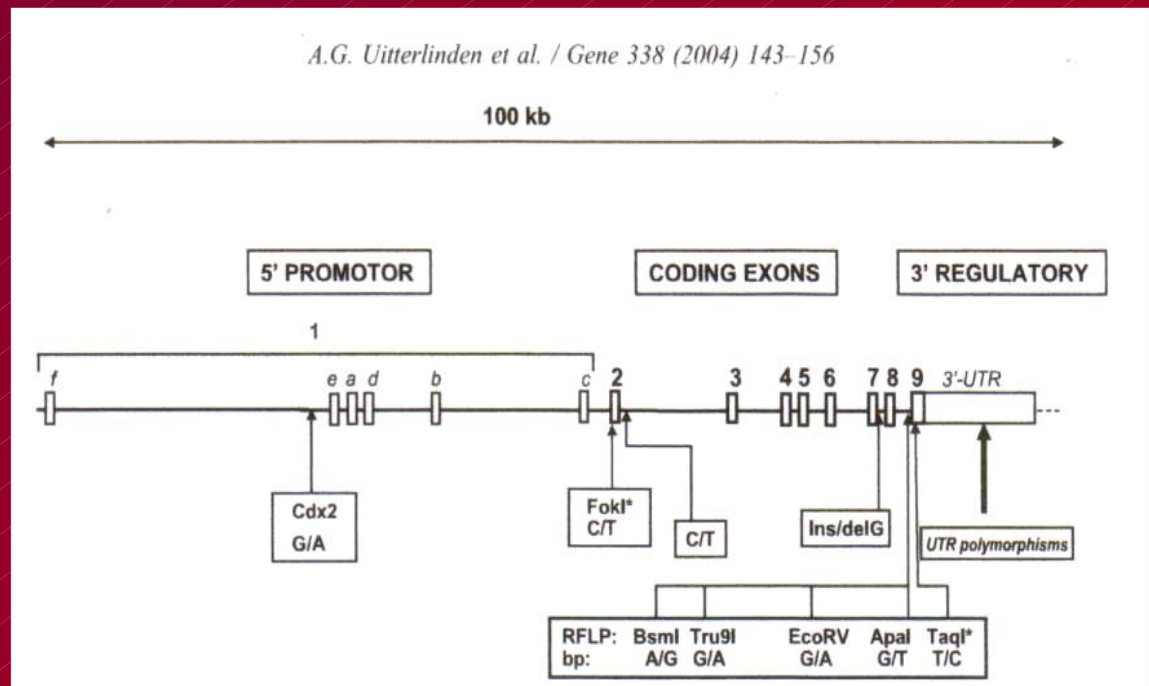
# Il Recettore della Vitamina D<sub>3</sub> (VDR)

Il **VDR** lega l'  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regolando l'espressione genica delle cellule bersaglio legandosi a sequenze specifiche del DNA dette "elementi di risposta" che si trovano nelle regioni regolatorie dei geni su cui agisce.

# Polimorfismo Allelico del Gene vdr

Studi hanno evidenziato l'esistenza, all'interno della sequenza del gene vdr, di vari siti polimorfici biallelici.

- *ApaI* (A, a)
- *TaqI* (T, t)
- *FokI* (F, f)
- *BsmI* (B, b)
- *Singlet(A)* (L, S)
- *Tru91* (A, G)
- *EcoRV* (E, e)



# Obiettivi della Ricerca Svolta

Lo scopo di questo studio è stato la valutazione del ruolo giocato dai polimorfismi *ApaI* e *TaqI* del gene *vdr* nell'insorgenza dell'uremia e in un fattore di rischio di mortalità ad essa associato come il diabete mellito.

# Materiali e Metodi

Lo studio è stato eseguito su **88 pazienti uremici**, non imparentati, di etnia caucasica e di età compresa tra i 45 e i 72 anni.

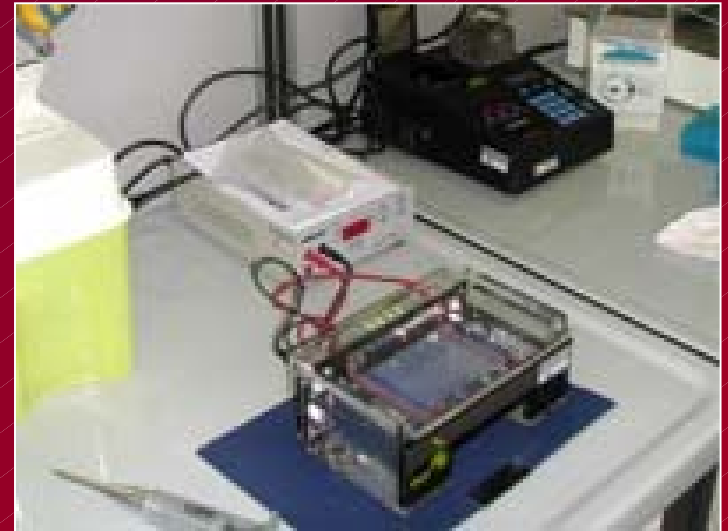
La popolazione di controllo è costituita da **150 soggetti sani**, senza legami di parentela tra loro, di età compresa tra 32 e 87 anni, di etnia caucasica.

Il **DNA** è stato estratto da leucociti contenuti in campioni di sangue venoso.

Estratto il **DNA**, è stata amplificata mediante **PCR** la parte del gene vdr contenente i siti studiati.



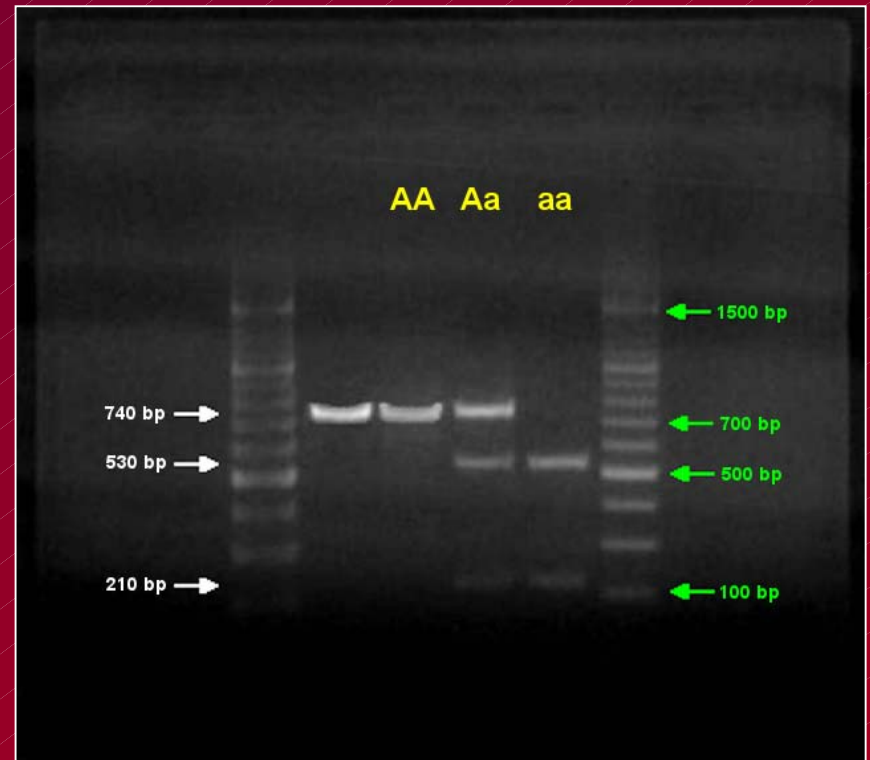
Per verificare che  
l'amplificazione sia  
avvenuta  
correttamente, i  
campioni amplificati  
sono stati sottoposti  
a **corsa**  
**elettroforetica su**  
**gel di agarosio.**



Per determinare l'assetto allelico del gene *vdr*, i campioni di **DNA** ottenuti dall'amplificazione sono stati sottoposti a restrizione con l'enzima *ApaI* o con l'enzima *TaqI*.

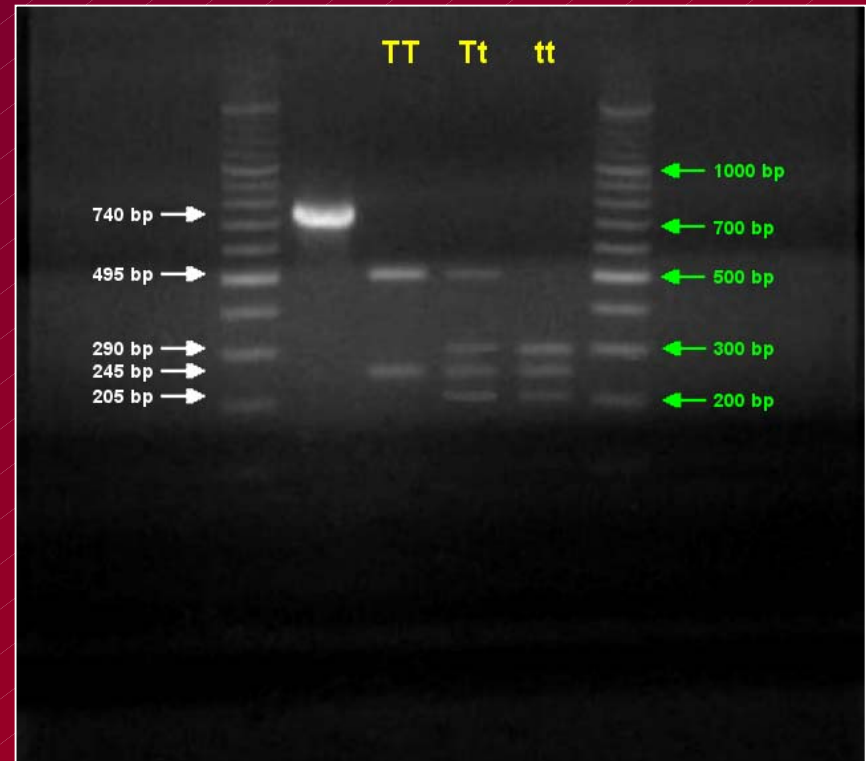
# Analisi di restrizione con l'enzima *ApaI*

Dall'analisi dei frammenti che sono derivati dalla restrizione con l'enzima *ApaI* sono stati individuati due alleli indicati come *a* o *A*.



# Analisi di restrizione con l'enzima *TaqI*

All'interno del frammento amplificato di 740 bp è sempre presente un **sito di taglio non specifico** riconosciuto dall'enzima di restrizione *TaqI*, pertanto si ottengono sempre due frammenti, uno di 495 bp e uno di 245 bp.



# Risultati

GENOTIPO	N. PAZIENTI UREMICI	FREQ. GENOTIPO	N. SOGGETTI SANI	FREQ. GENOTIPO
<b>AA</b>	30	0,34	40	0,27
<b>Aa</b>	45	0,51	76	0,50
<b>aa</b>	13	0,15	34	0,23
<b>Totale</b>	88	1,00	150	1,00

Sono state valutate le **frequenze alleliche** nei soggetti uremici e nei soggetti sani usando le formule:

- $freq. (A) = freq. AA + \frac{1}{2} freq. Aa$
- $freq. (a) = freq. aa + \frac{1}{2} freq. Aa$

L'analisi dei **soggetti uremici** ha prodotto i seguenti risultati:

- $freq. (A) = 0,60$
- $freq. (a) = 0,40$

L'analisi dei **soggetti sani** ha prodotto i seguenti risultati:

- $freq. (A) = 0,52$
- $freq. (a) = 0,48$

La differenza tra le frequenze alleliche **non è significativa**.

<b>GENOTIPO</b>	<b>N. PAZIENTI UREMICI</b>	<b>FREQ. GENOTIPO</b>	<b>N. SOGGETTI SANI</b>	<b>FREQ. GENOTIPO</b>
<b>TT</b>	<b>31</b>	<b>0,35</b>	<b>59</b>	<b>0,39</b>
<b>Tt</b>	<b>42</b>	<b>0,48</b>	<b>71</b>	<b>0,47</b>
<b>tt</b>	<b>15</b>	<b>0,17</b>	<b>20</b>	<b>0,14</b>
<b>Totale</b>	<b>88</b>	<b>1,00</b>	<b>150</b>	<b>1,00</b>

Sono state valutate le **frequenze alleliche** nei soggetti uremici e nei soggetti sani usando le formule:

- $freq. (T) = freq. TT + \frac{1}{2} freq. Tt$
- $freq. (t) = freq. tt + \frac{1}{2} freq. Tt$

L'analisi dei **soggetti uremici** ha prodotto i seguenti risultati:

- $freq. (T) = 0,59$
- $freq. (t) = 0,41$

L'analisi dei **soggetti sani** ha prodotto i seguenti risultati:

- $freq. (T) = 0,63$
- $freq. (t) = 0,37$

*La differenza tra le frequenze alleliche **non è significativa.***

La popolazione costituita dagli 88 pazienti uremici è stata suddivisa in due sottopopolazioni sulla base dei valori di glicemia: si considera "diabetico" il soggetto che presenta un valore di glicemia a digiuno maggiore o uguale a 126 mg/dl.

GENOTIPO	N. PAZIENTI DIABETICI	FREQ. GENOTIPO
AA	9	0,31
Aa	17	0,59
aa	3	0,10
TOTALE	29	1,00

<b>GENOTIPO</b>	<b>N. PAZIENTI NORMOGLICEMICI</b>	<b>FREQ. GENOTIPO</b>
<b>AA</b>	<b>21</b>	<b>0,36</b>
<b>Aa</b>	<b>28</b>	<b>0,47</b>
<b>aa</b>	<b>10</b>	<b>0,17</b>
<b>TOTALE</b>	<b>59</b>	<b>1,00</b>

L'analisi delle **frequenze alleliche** nella popolazione **diabetica** ha prodotto i seguenti risultati:

- $freq. (A) = 0,60$
- $freq. (a) = 0,40$

L'analisi delle frequenze alleliche nella popolazione **normoglicemica** ha prodotto invece i seguenti risultati:

- $freq. (A) = 0,59$
- $freq. (a) = 0,41$

La differenza tra le frequenze alleliche **non è significativa.**

<b>GENOTIPO</b>	<b>N. PAZIENTI DIABETICI</b>	<b>FREQ. GENOTIPO</b>
<b>TT</b>	<b>11</b>	<b>0,38</b>
<b>Tt</b>	<b>13</b>	<b>0,45</b>
<b>tt</b>	<b>5</b>	<b>0,17</b>
<b>TOTALE</b>	<b>29</b>	<b>1,00</b>

<b>GENOTIPO</b>	<b>N. PAZIENTI NORMOGLICEMICI</b>	<b>FREQ. GENOTIPO</b>
<b>TT</b>	<b>20</b>	<b>0,34</b>
<b>Tt</b>	<b>29</b>	<b>0,49</b>
<b>tt</b>	<b>10</b>	<b>0,17</b>
<b>TOTALE</b>	<b>59</b>	<b>1,00</b>

L'analisi delle **frequenze alleliche** nella popolazione **diabetica** ha prodotto i seguenti risultati:

- $freq. (T) = 0,60$
- $freq. (t) = 0,40$

L'analisi delle frequenze alleliche nella popolazione **normoglicemica** ha prodotto invece i seguenti risultati:

- $freq. (T) = 0,58$
- $freq. (t) = 0,42$

La differenza tra le frequenze alleliche **non è significativa.**

# Conclusioni

Gli obiettivi prefissi all'inizio dello studio sono stati dunque raggiunti: quello che emerge è la **mancaanza di correlazione** tra polimorfismi *ApaI* e *TaqI*, insorgenza dell' **uremia** e comparsa del **diabete mellito** nei soggetti uremici.